



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALESSANDRA CARLA GUIMARÃES SOBRINHO

ESTUDO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE *BYRSONIMA CRASSIFOLIA*
E *INGA EDULIS*, VISANDO À PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO.

BELÉM-PA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALESSANDRA CARLA GUIMARÃES SOBRINHO

ESTUDO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE *BYRSONIMA CRASSIFOLIA*
E *INGA EDULIS*, VISANDO À PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Prof. Dr. Jesus N. S. de Souza (Orientador)

BELÉM-PA

2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistemas de Biblioteca da UFPA**

Guimarães Sobrinho, Alessandra Carla, 1991-

Estudo dos compostos bioativos de folhas de *Byrsonima Crassifolia* e *Inga Edulis*, visando à purificação e identificação/Alessandra Carla Guimarães Sobrinho.- 2016.

Orientador: Jesus N. S. de Souza

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2016.

1. Engenharia bioquímica 2. Compostos bioativos das plantas 2. Murici (Planta) 3. Ingá (Botânica) 4. Antioxidantes 5. Fitoquímicos I. Título

CDD 23.ed.660.63

ALESSANDRA CARLA GUIMARÃES SOBRINHO

ESTUDO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE *BYRSONIMA CRASSIFOLIA*
E *INGA EDULIS*, VISANDO À PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DATA DA AVALIAÇÃO: ____/____/____

CONCEITO: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jesus N. Silva de Souza
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof. Dr. Hervé L. Ghislain Rogez
(PPGBIOTEC/ICB /UFPA – Membro)

Prof^a. Dr^a. Consuelo L. Sousa de Lima
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Milton N. da Silva
(PPGBIOTEC/ICEN /UFPA – Suplente)

Prof^a. Dr^a. Geormenny R. dos Santos
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Suplente)

BELÉM-PA

2016

DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste trabalho principalmente a Deus, aos meus pais Antonio e Delcy Sobrinho, aos meus irmãos Alexandre e Alexandro Sobrinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e coragem para superar todos os momentos difíceis ao longo desse mestrado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo suporte financeiro para execução deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Jesus Souza pela orientação, oportunidade, conhecimentos passados e amizade.

Ao Prof. Hervé Rogez pela disponibilidade de ajuda e sugestões, contribuindo sempre para o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof. Consuelo Lima pelo conhecimento repassado para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

Aos meus pais Antonio e Delcy Sobrinho, pois são os responsáveis por essa vitória, pois por todas as vezes que pensei em desistir foram vocês que me fizeram seguir em frente. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Alexandre e Alexandro Sobrinho pelo carinho e amizade. Amo demais vocês!

Aos meus colegas de trabalho do Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA), em especial ao Bruno Brito, a Mayumi Konagano e Wesley Maciel pelo auxílio técnico, amizade e momentos agradáveis vivenciados.

A todos vocês que participaram direta ou indiretamente na realização desta dissertação deixo os meus sinceros agradecimentos:

*Quando menos esperamos, encontramos o que temos
procurado durante toda a vida.*

RESUMO

Atualmente, a Região Amazônica, em função da sua biodiversidade apresenta um crescente interesse na busca por espécies vegetais que sintetizem compostos bioativos. Dentro desse contexto, o muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*) e o ingazeiro (*Inga edulis*) destacam-se, pois apresentam elevados conteúdos fenólicos em extratos de suas folhas em relação a outras plantas amazônicas contribuindo assim para capacidade antioxidante. Não obstante torna-se importante a avaliação de outros compostos antioxidantes presentes nestas matrizes amazônicas, além dos compostos fenólicos, visto que contribui para a caracterização mais abrangente dos compostos responsáveis por essa capacidade. Assim é importante verificar a presença de outras moléculas com tais propriedade, como por exemplo, os esteroides vegetais (fitoesteróis) e os terpenoides. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar os compostos antioxidantes de duas matrizes vegetais amazônicas, avaliando a sua capacidade antioxidante, purificação e a identificação dos principais compostos responsáveis por essa capacidade. Os testes fitoquímicos confirmaram a presença de fitoesteróis e terpenoides na fração acetato de etila e metanólica respectivamente para a *Byrsonima crassifolia* e para o *Inga edulis* a fração metanólica foi à fração que se apresentou positiva para os testes. A capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC e DPPH indicaram que tanto os extratos brutos quanto as frações apresentam essa propriedade, em maior ou menor nível, com destaque para as frações metanólicas. As frações metanólicas das diferentes espécies apresentam alto teor em polifenóis totais, além da presença de fitoesteróis e terpenoides contribuindo assim como alto valor de ORAC e DPPH, indicando que os compostos presentes nas frações metanólicas possuem boa capacidade antioxidante. Apesar de a fração acetado de etila ter apresentado o menor valor de capacidade antioxidante e ser a fração com resultado positivo para esteroides vegetais para a *Byrsonima crassifolia*, o estudo pode evidenciar a importância da concentração elevada desse composto para a maior capacidade antioxidante. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento de novos compostos bioativos responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos vegetais das espécies amazônicas.

Palavras-chaves: *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis*, capacidade antioxidante, compostos bioativos.

ABSTRACT

Currently, the Amazon region, according to its biodiversity has a growing interest in the search for species that synthesize bioactive compounds. In this context, the “muricizeiro” (*Byrsonima crassifolia*) and “ingazeiro” (*Inga edulis*) stand out, as have high phenolic content in extracts of its leaves in relation to other Amazonian plants thus contribute to antioxidant capacity. Nevertheless it is important to the evaluation of other antioxidant compounds present in these matrices Amazon, in addition to phenolic compounds, as they contribute to the more comprehensive characterization of the compounds responsible for this capacity. Thus it is important to check the presence of other molecules with such property, for example, plant sterols (phytosterols) and terpenoids. Thus, the objective of this work was to study the antioxidant compounds of two Amazonian plants, evaluating their antioxidant capacity, purification and identification of the main compounds responsible for this ability. Phytochemicals tests confirmed the presence of phytosterols and terpenoids in ethyl acetate fraction and methanol respectively to *Byrsonima crassifolia* and the *Inga edulis* the methanolic fraction was the fraction that was positive for the tests. The antioxidant capacity determined by ORAC and DPPH indicated that both crude extracts as fractions have this property, in greater or lesser degree, especially the fractions methanolic. The methanolic fractions of different species have high content of total polyphenols and the presence of phytosterols and terpenoids thereby contributing to high ORAC value and DPPH, indicating that the compounds in methanolic fractions had good antioxidant activity. Although the ethyl acetate fraction having submitted the lowest antioxidant capacity and be the fraction with positive for steroids vegetables *Byrsonima crassifolia*, the study may highlight the importance of high concentration of this compound for the most antioxidant capacity. The results of this study contribute to the knowledge of new bioactive compounds responsible for antioxidant capacity of plant extracts of Amazonian species.

Keywords: *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis*, antioxidant capacity, bioactive compounds.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
SUMÁRIO.....	10
INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO I. OBJETIVOS.....	14
I.1 OBJETIVO GERAL.....	15
I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO II. REVISÃO DA LITERATURA	16
II.1 MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS	17
II.1.2 BYRSONIMA CRASSIFOLIA.....	17
II.1.2 INGA EDULIS.....	18
II.2 ANTIOXIDANTES	19
<i>II.2.1 Métodos de avaliação da capacidade antioxidante</i>	<i>21</i>
<i>II.2.1.1 Método de Folin-Ciocalteu (polifenóis totais).....</i>	<i>21</i>
<i>II.2.1.2 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)</i>	<i>22</i>
<i>II.2.1.3 DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....</i>	<i>23</i>
II.3 METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE MATRIZES VEGETAIS	24
<i>II.3.1 Generalidades do metabolismo.....</i>	<i>24</i>
<i>II.3.1.1 Compostos fenólicos.....</i>	<i>25</i>
<i>II.3.1.2 Terpenóides.....</i>	<i>26</i>
<i>II.3.1.3 Esteroides vegetais.....</i>	<i>28</i>
II.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES.....	30
II.5 TESTES FITOQUÍMICOS	31
<i>II.5.1 Testes para terpenoides: Salkowski</i>	<i>31</i>
<i>II.5.2 Testes para esteróis: Liebermann- Burchard</i>	<i>31</i>
<i>II.5.3 Testes para compostos fenólicos: Folin-Ciocalteu.....</i>	<i>32</i>
II.6 TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	33
<i>II.6.1 Extração em fase sólida (SPE- Solid Phase Extraction)</i>	<i>33</i>

II.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatograph).....	34
II.6.3 Técnicas hífenadas e métodos espectrométricos: ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM).....	35
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS	45
III.1 MATERIA PRIMA: COLETA E IDENTIFICAÇÃO	46
III.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	46
III.2.1 Preparo das amostras e extração dos compostos	46
III.2.2 Testes fitoquímicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários	47
III.2.3 Avaliação do teor total de polifenóis, esteroides, terpenóides e da capacidade antioxidante do extrato bruto das folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i> e <i>Inga edulis</i>	48
III.2.3.1 Teor de polifenóis totais	48
III.2.3.2 Teor de esteroides totais	49
III.2.3.3 Teor de terpenóides totais.....	49
III.2.3.4 Método ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio)	50
III.2.3.5 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	51
III.2.4 Preparo das amostras em SPE para análise em HPLC	51
III.2.4.1 Extração em fase sólida (SPE) para compostos fenólicos.....	51
III.2.5 Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, identificação e quantificação dos compostos bioativos	52
III.2.5.1 Condições analíticas do perfil cromatográfico para compostos fenólicos	52
III.2.5.2 Análise HPLC – ESI - HRMS	53
III.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO IV.....	56
AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE FOLHAS DE <i>BYRSONIMA CRASSIFOLIA</i> E <i>INGA EDULIS</i>.....	56
INTRODUÇÃO	57
PARTE EXPERIMENTAL.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS	71

INTRODUÇÃO

Os estudos dos compostos bioativos com capacidade antioxidante têm despertado grande interesse devido principalmente às descobertas da ação deles sobre os radicais livres no organismo. Por outro lado às formas de interações moleculares e mecanismos de bioatividade desses compostos proporcionam um desafio para os cientistas (BARREIROS, 2006; HEMAMALINI et al., 2013).

A utilização de antioxidantes sintéticos para prolongar a estabilidade dos produtos alimentícios durante processamento e estocagem é frequentemente utilizada na indústria, entretanto estas substâncias vêm sendo relacionadas com efeitos danosos a saúde. Assim, a busca por antioxidantes de fontes naturais que possam substituir os sintéticos tem recebido muita atenção por parte do segmento industrial e acadêmico (BOTTERWECK et al., 2000; DAHANUKAR; KULKANI; REGE, 2000; DECKER, 2008; MATKOWSKI, 2008).

A região Amazônica, em função de sua enorme biodiversidade vegetal ainda pouco investigada, mostra-se como uma importante fonte de vegetais que apresentam elevados teores de compostos bioativos (SILVA et al., 2007a; SOUZA et al., 2007). Dentre as fontes vegetais destacam-se o muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*) e o ingazeiro (*Inga edulis*) espécies selecionadas a partir de estudos prévios que mostraram elevados valores de capacidade antioxidante e de conteúdo fenólico em extratos de suas folhas em relação a outras plantas amazônicas (SILVA et al., 2007b; SOUZA et al. 2008).

A busca por novos compostos responsáveis pela capacidade antioxidante, além dos compostos fenólicos dessas matrizes vegetais, têm tido um intenso interesse de pesquisas. Assim é importante verificar a presença de outras moléculas com propriedades antioxidantes, como por exemplo, os esteroides vegetais (fitoesteróis) e os terpenoides.

Várias pesquisas sugerem que fitoesteróis, tais como β -sitosterol, é responsável, pelo menos em parte, por efeitos protetores contra as espécies reativas de oxigênio (YOSHIDA; NIKI, 2003; VIVACONS; MORENO, 2005). Os fitoesteróis apresentam potencial antioxidante e diversas funções a nível molecular, acredita-se que ele reduz o risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer. Ao longo dos últimos anos, seus efeitos benéficos à saúde resultaram em um grande interesse em quantificá-los em matrizes vegetais. Nas plantas, mais de 200 tipos diferentes de fitoesteróis têm sido relatados, sendo os mais abundantes β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (COSTA, 2010). Outra importante classe são os terpenóides, tais como o linalol, que apresentam capacidade antioxidante (GRASSMAN,

2005; CARVALHO; FONSECA, 2006). Tanyildizi et al. (2009) evidenciaram o efeito antioxidante do linalol associado à diminuição da formação de malondialdeídos (MDA) na peroxidação lipídica induzida. Em outro estudo, Celik e Oskaya (2002) demonstraram que o efeito inibitório da peroxidação lipídica atribuído ao linalol é comparável a do α -tocoferol e do ácido lipóico, podendo dessa forma proteger ácidos graxos insaturados, com perspectiva de uso em terapias complementares aos danos causados pelo estresse oxidativo.

Em virtude das propriedades terapêuticas dos compostos citados, o interesse em quantificá-los tem crescido. O estudo destas plantas amazônicas, ricas em compostos bioativos, pode favorecer a descoberta de novos compostos antioxidantes, fato que auxiliaria no desenvolvimento econômico e tecnológico da região.

CAPÍTULO I. OBJETIVOS

I.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os compostos bioativos de duas matrizes vegetais amazônicas, avaliando a sua capacidade antioxidante, purificação e a identificação dos principais compostos responsáveis por essa capacidade.

I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes fitoquímicos para identificação de terpenóides, esteroides vegetais e compostos fenólicos nas folhas de *B. crassifolia* e *I. edulis*;
- Avaliar a concentração em terpenóides totais, esteroides totais e compostos fenólicos totais em extratos e frações das folhas de *B. crassifolia* e *I. edulis*;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos e das frações obtidas;
- Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos e frações obtidas;

CAPÍTULO II. REVISÃO DA LITERATURA

II.1 MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS

II.1.2 BYRSONIMA CRASSIFOLIA

O gênero *Byrsonima* tem aproximadamente 150 espécies nativas da América tropical (SANNOMIYA et al., 2007). A *B. crassifolia* (Figura 1) popularmente conhecida como “muricizeiro” é uma árvore tropical da família das Malpighiaceae que pode ser encontrada no México, América Central e do Sul (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al, 1999, CARVALHO; NASCIMENTO, 2013). As folhas e cascas são usadas na medicina popular para tratar tosses, dermatoses fúngicas, diarreia e mordida de cobra (BEJAR et al., 1995; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1999).



Figura 1 – Folhas de *Byrsonima crassifolia*. (Fonte: Arquivo pessoal).

As propriedades terapêuticas desta planta têm sido associadas à presença de fitoquímicos, tais como: triterpenos, flavonóides, esteróis, ésteres aromáticos e aminoácidos não-protéicos (CORREA; VOZZO, 2002). Estudos fitoquímicos realizados com a espécie *B. crassifolia* identificaram a presença de ácidos fenólicos (ácido gálico e protocatecuico), flavanóis (catequina e epicatequina), flavonóis (quercetina-3-*O*- β -D-galactosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-glicosídeo, quercetina-3-*O*- α -D-arabinosídeo e quercetina-3-*O*- α -D-arabinosídeo-2''-galato), proantocianidinas (B₁ e B₂), 3-*O*-xilosídeo, rutina, hesperidina (BEJAR et al., 1995; SOUZA et al., 2008; HÉRENT et al., 2010; HERRERA-RUIZ et al., 2011).

II.1.2 INGA EDULIS

Inga é um gênero extenso de árvore leguminosa nativa dos trópicos úmidos americanos. *Inga edulis* Mart. (Figura 2) é uma entre as mais de 300 espécies de inga da família Fabaceae das Leguminosas, (RICHARDSON et al.,2001). Amplamente distribuída e cultivada, a espécie possui muitos nomes vulgares, mostrando a sua importância para a população: ingá, ingá-cipó, ingá-de-metro, ingá-doce, ingá-de-macaco, ingá-macarrão, rabo-de-mico (Brasil); guamo, guama (Colômbia, Venezuela, Costa Rica); paca, sogá, paca silvestre (Peru) (FALCÃO; CLEMENT, 2000).



Figura 2 – Folhas de *Inga edulis*. (Fonte: Arquivo pessoal).

A faixa nativa do *Inga edulis* é a Amazônia do Brasil, Bolívia, Peru, Equador e Colômbia. A espécie foi também introduzida na maior parte da América do Sul e Central. É tolerante a solos ácidos e tem sido bastante utilizada para prover sombra para culturas perenes, controle de plantas invasoras e para a cobertura do solo por meio da liteira acumulada (FALCÃO e CLEMENT, 2000).

Na medicina popular esta espécie é utilizada como antidiarreico e a infusões das folhas é utilizada como anti-inflamatório (SILVA et al., 2007a). A quantidade de compostos fenólicos presentes nas folhas pode fornecer a explicação para suas propriedades medicinais. O extrato das folhas de *Inga edulis* apresenta elevada proteção contra a oxidação do LDL, atividade anti-hemólise, altos valores de capacidade antioxidante (Oxygen Radical Absorbance Capacity - ORAC e Total Radical-trapping Antioxidant Potential - TRAP) (SOUZA et al., 2008). Os seguintes compostos polifenólicos já foram identificados: ácidos fenólicos (ácido gálico), flavanóis ((+) catequina e (-) epicatequina), flavonóis (miricetina-3-raminopiranosídeo, quercetina-3-raminopiranosídeo e quercetina-3-glicosídeo) e

proantocianidinas (B₁ e B₂). Isto sugere um elevado potencial desta espécie como fonte de antioxidantes naturais para uso medicinal e alimentício (SOUZA, et al., 2007; DIAS et al., 2010).

As propriedades antioxidantes das folhas de *I. edulis* têm despertado interesse na valorização de seus compostos bioativos. Silva et al., (2007b) otimizaram o processo de extração sólido-líquido maximizando a quantidade de fenólicos, flavanóis e flavonóis totais.

II.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são compostos que, presentes em baixas concentrações quando comparadas ao substrato oxidável, apresentam efeitos sobre os radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos e consequentemente benefícios a saúde e bem estar do individuo (DECKER; MATKOWSKI, 2008; VASCONCELOS, 2014).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados. Esta configuração faz com que essas moléculas sejam altamente reativas e, em excesso, interfiram negativamente na manutenção de muitas funções fisiológicas normais do organismo (BIANCHI; ANTUNES, 1999; FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008), também conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN), que encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes no organismo (BARREIROS et al., 2006; FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008).

Na Figura 3, observa-se um esquema simplificado de uma molécula estável (à esquerda) que ao perder um elétron, a molécula torna-se um radical livre (à direita), ficando altamente reativa e instável (BÄCHTOLD, 2013).

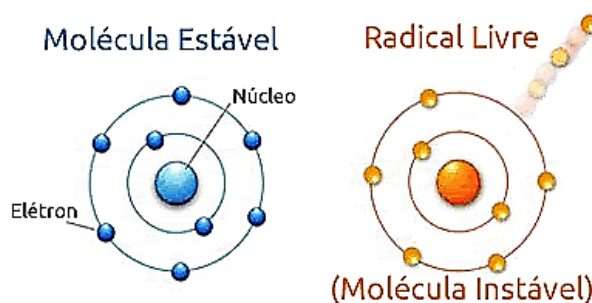
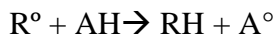
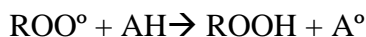


Figura 3 – Esquema simplificado de uma molécula estável e de um radical livre. (Fonte: BÄCHTOLD, 2013).

Em função do mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em: primários e secundários. Os primários são aqueles capazes de atrasar ou inibir as etapas de

iniciação ou, ainda, interromper a propagação da auto oxidação ao doarem átomos de hidrogênio, interrompendo, assim, a reação em cadeia (SUCUPIRA et al., 2012).



Onde: ROO° e R° são radicais livres; AH, antioxidante com um hidrogênio ativo; e A° , radical inerte.

Na reação, o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante primário é abstraído pelos radicais livres R° e ROO° mais facilmente que os hidrogênios alílicos. O radical antioxidante produzido pela doação do hidrogênio é estabilizado por ressonância e torna-se reativamente fraco, por consequência, a taxa de propagação da oxidação é diminuída (SUCUPIRA et al., 2012).

A função do antioxidante, como é observada na Figura 4, é doar um elétron para o radical livre, de modo que ele se torne estável, sendo que o antioxidante também deve permanecer estável para não gerar um novo radical livre (BÄCHTOLD, 2013).

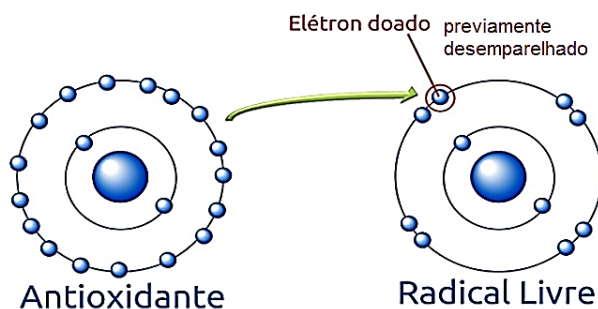


Figura 4 – Esquema simplificado de um antioxidante e de um radical livre. (Fonte: BÄCHTOLD, 2013).

Os antioxidantes secundários agem por meio de muitos mecanismos. Eles diminuem a taxa de oxidação, mas não convertem radicais livres em produtos mais estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, repor moléculas de hidrogênio para os primários decompor hidroperóxidos para formar espécie não radical, desativar oxigênio singleto e absorver radiação ultravioleta ou agir como sequestradores de oxigênio (SUCUPIRA et al., 2012).

As indústrias de alimentos fazem o uso de antioxidantes sintéticos, pois são eficazes em inibir a oxidação dos lipídios. A ação desses antioxidantes está baseada na capacidade de doar prótons ou elétrons aos radicais livres, transformando-os em moléculas não reativas. O potencial de antioxidantes sintéticos que causam efeitos toxicológicos criou demanda por

antioxidantes naturais por parte dos consumidores e da indústria de alimentos (KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013).

Desta forma, pesquisas com antioxidantes naturais têm sido relatadas, devido às suspeitas de que os antioxidantes sintéticos sejam adversos à saúde, assim direcionando os estudos para os compostos naturais que apresentam esta capacidade e que venham a substituir os artificiais ou atuar em conjunto com os mesmos, reduzindo seus teores nos alimentos (KULKARNI, et al., 2011; SAMPAIO et al., 2012; SHI et al., 2014; GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015).

II.2.1 Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

Diversos métodos são descritos para medir a capacidade antioxidante de uma amostra, entretanto nenhum reflete verdadeiramente esta propriedade, uma vez que nenhum método existente contemple todos os mecanismos de ação de um determinado antioxidante (ROBARDS et al., 1999). De maneira geral, diferentes metodologias têm sido propostas para mensurar a capacidade antioxidante de amostras vegetais, como o ORAC (Oxygen Radical Absorbance), o TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), o de Folin-Ciocalteu, o FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), o TBARS-LDL (Thiobarbituric Acid Reactive Substances-Low Density Lipoprotein), entre outros (ALMAJANO et al., 2008).

Estes métodos diferem em relação ao mecanismo de reação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos. Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes métodos, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (DE OLIVEIRA, 2009). Estes métodos podem ser baseados na transferência de elétrons, que medem a habilidade de redução do substrato (antioxidante) ou de átomos de hidrogênio, os quais avaliam a habilidade do substrato em doar hidrogênio (ROBARDS et al., 1999; MacDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006).

II.2.1.1 Método de Folin-Ciocalteu (polifenóis totais)

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos ou outros de natureza não fenólica, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, que absorvem em $\lambda_{\text{máx}}=750 \text{ nm}$ e cuja

coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (OLIVEIRA et al., 2009). A reação ocorre em meio alcalino e a solução de Na_2CO_3 é a base mais indicada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions produzirem a oxidação (MOYER et al., 2002).

Apesar da química do reagente de Folin-Ciocalteu ainda não estar bem definida, o ensaio é conveniente, simples e reprodutivo. Como resultado, uma grande massa de dados está sendo acumulado através deste e está se tornando um ensaio rotineiro no estudo de antioxidantes, uma vez que se estabeleceu uma correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de produtos naturais (PICCINELLI et al., 2004; ATOUI et al., 2005; SALVADOR et al., 2006; STRATIL et al., 2006; TERMENTZI et al., 2006; JAYAPRAKASHA et al., 2007; SURVESWARAN et al., 2007).

II.2.1.2 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) avalia a capacidade de absorção de radicais oxigênio. Utiliza-se uma substância fluorescente, comumente a fluoresceína como marcador de fluorescência, cujo objetivo é medir a diminuição da emissão de fluorescência na presença de um azoindicador gerador de radical tal como AAPH (dicloreto de 2,2-azobis (2-amidinopropano)) (ALVES et al., 2010).

Inicialmente, o composto fluorescente utilizado para reagir com o radical peroxila formado era a β - ficoeritrina. Mas foi observado que a β - ficoeritrina interagiu com os compostos fenólicos levando a erros neste método. No entanto, OU et al. (2001) desenvolveram e validaram uma modificação do ORAC usando a fluoresceína como composto fluorescente, que perde a fluorescência indicando reação com o radical peroxila. Além disso, a fluoresceína mostrou excelente fotoestabilidade, redução dos custos deste experimento e não interage com antioxidantes.

O método utiliza uma técnica de medida da área sob a curva (*Area Under the Curve - AUC*) para a quantificação, o que permite combinar ao mesmo tempo a porcentagem de inibição e a medida do tempo de inibição da ação dos radicais livres pelos antioxidantes, em só um valor (Figura 5). Esse é um dos fatores que torna este um método de referência (CAO et al., 1995; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

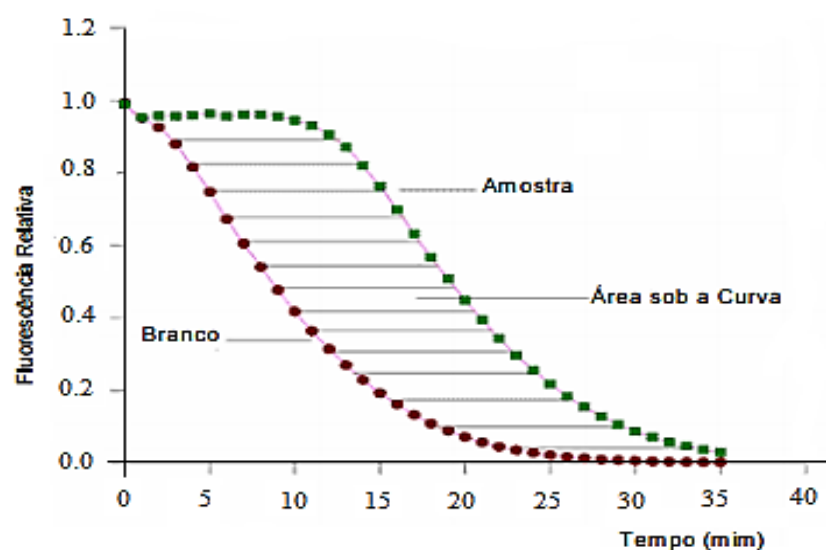


Figura 5- Gráfico da área sob a curva. (Fonte: PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

II.2.1.3 DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O método DPPH baseia-se na transferência de um elétron (SET – *Single Eletron Transfer*), enquanto que a transferência do átomo de hidrogênio (HAT – *Hydrogen Atom Transfer*) é uma reação secundária, pois ocorre lentamente em solventes que possuem fortes ligações de hidrogênios, como o metanol e o etanol (HUANG, OU; PRIOR, 2005; MAGALHAES et al., 2008).

Brand-williams et al. (1995) propuseram o método envolvendo a utilização do radical DPPH●, no qual compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de metanol ou etanol e a mudança de cor da solução (de violeta escuro para amarelo claro) indica a ocorrência da reação (Figura 6). A redução do DPPH● é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorvância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH● apresenta absorvância a 517 nm, mas sob redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R●) a absorvância diminui.

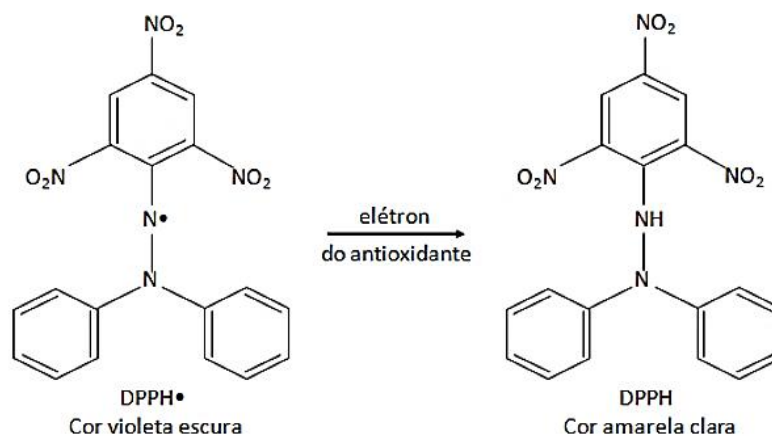


Figura 6- Reação de sequestro do radical livre DPPH•. (Fonte: SANTOS, 2013).

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de capacidade antioxidante, micromols de equivalente do padrão utilizado (trolox, por exemplo) ou ainda como EC₅₀, que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração de radical livre do meio em 50% (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

II.3 METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE MATRIZES VEGETAIS

II.3.1 Generalidades do metabolismo

As plantas estão limitadas ao mesmo local durante toda sua vida. Como adaptação ao meio, tais organismos desenvolveram defesas químicas e estruturais em resposta aos estresses abióticos, causados por fatores ambientais, como por exemplo, deficiência a nutrientes, estresse hídrico, temperatura excessiva e poluição em resposta aos estresses bióticos, causados por invasores, tais como, bactérias, fungos, protozoários, insetos e vertebrados (PASTOR et al., 2014).

Uma das estratégias de defesa da planta é a produção de metabolitos secundários, os quais agem através de sua toxicidade a fim de eliminar os herbívoros e patógenos que atuam contra o sistema imune da planta (PASTOR et al., 2013). Os metabolitos secundários participam frequentemente na defesa da planta contra estresses, como intermediário das interações entre as plantas e outros organismos (PIETERSE et al., 2012)

Um ponto que chama a atenção é a elevada capacidade biossintética do metabolismo secundário, já que há grande produção tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto a sua diversidade numa mesma espécie (ROBBERS et. al. 1996).

Em várias espécies, o local de biossíntese está restrito a um órgão, enquanto que os produtos são acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes devido a um sistema de transporte intercelular. Às vezes, o local de compartimentalização é de fundamental importância para a sobrevivência da planta (SANTOS, 2004).

II.3.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos exibem uma grande variedade de estruturas e são responsáveis por algumas características organolépticas dos alimentos de origem vegetal, além de contribuírem para a qualidade nutricional de frutas e legumes (TAPAS et al, 2008). Os compostos fenólicos desempenham um importante papel no crescimento e reprodução dos vegetais, fornecendo proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e predadores (BRAVO, 1998).

Em termos de estrutura química os compostos fenólicos apresentam um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila (Quadro 1).

Quadro 1 - Classes de compostos fenólicos.

Classes	Estrutura
Fenóis simples, bezoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenonas, ácido fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos e fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Stilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: ANGELO; JORGE 2007

Os compostos fenólicos são derivados da fenilalanina formada a partir da rota metabólica do ácido chiquímico (HOU, 2010). A desaminação da fenilalanina, catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL), resulta na formação do ácido cinâmico, conforme Figura 7 (SHAHIDI; NACZK, 2006). A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz (pelo seu efeito no citocromo) e infecção por fungos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

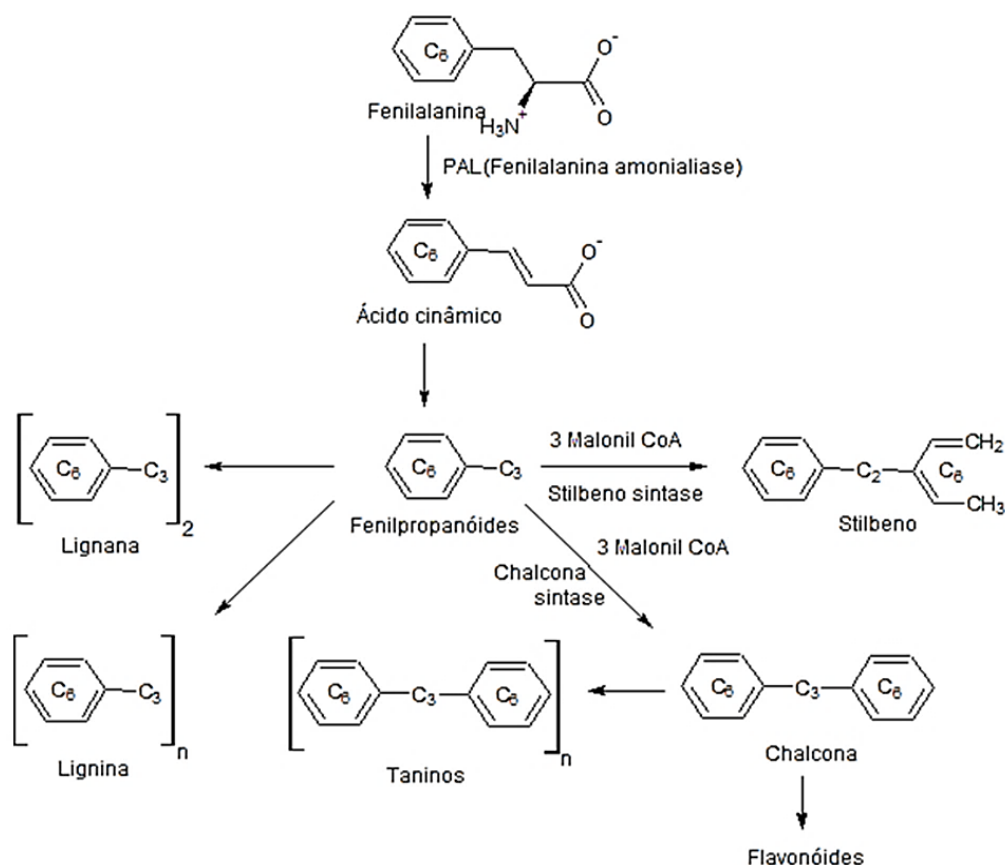


Figura 7 - Formação das diferentes classes de compostos fenólicos a partir da fenilalanina.

(Fonte: SHAHIDI; NACZK, 2006).

As reações subsequentes àquelas catalisadas pela PAL dão origem as demais classes de compostos fenólicos (TAIZ, ZEIGER, 2004). A condensação do fenilpropanóide com três moléculas de malonil-CoA origina a chalcona. Este composto sofre uma série de reações de hidroxilação, metilação, dimerização e glicosilação que resultam nas diferentes classes de flavonóides (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes (KARAKAYA, 2004; NINFALI et al., 2005; SILVA et al., 2007b; SOUZA et al. 2008; ROCHA et al., 2011). Os compostos fenólicos são considerados os antioxidantes mais comuns de fontes naturais, apresentam-se amplamente distribuídas no reino vegetal (KARAKAYA,2004).

II.3.1.2 Terpenóides

Os terpenóides são representantes de uma das maiores e mais variadas classes de metabólitos secundários de origem natural, com mais de 55.000 membros já isolados

(MAIMONE; BARAN, 2007; SILVA et al., 2009; FATURI et al., 2010). Com isso, representam a família mais extensa e estruturalmente diferente dentre os produtos naturais, derivados de unidades de isopreno (C₅). Os terpenóides podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos que constituem: hemiterpenóides, monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, tetraterpenóides e politerpenóides (OLIVEIRA et al., 2003).

Os terpenóides ou isoprenoides constituem uma classe de produtos naturais obtidos de plantas com a maior variedade estrutural e funcional. Alguns destes compostos participam de processos como respiração e desenvolvimento celular, portanto importantes ao metabolismo primário. Entretanto, a maioria dos terpenóides são produtos do metabolismo secundário, tendo como função intermediar a relação planta versus ambiente (PHILLIPS et al., 2008).

Os terpenoides, tais como o linalol, apresentam grande importância em função da sua capacidade antioxidante (CHOI et al., 2000; ANJO, 2004; MA et al., 2014). A auto-oxidação do linalol (Figura 8) pode ser o mecanismo de ação antioxidante do composto, onde os radicais gerados são formados devido à abstração de um átomo de H da molécula na presença de O₂, que inclui a formação de epóxido como um produto primário que pode sofrer o ataque intramolecular da hidroxila com abertura do anel oxirânico e formação do anel furânico ou a isomerização em álcool alélico. (BACKTORP et al., 2006; SPEZIALI, 2008).

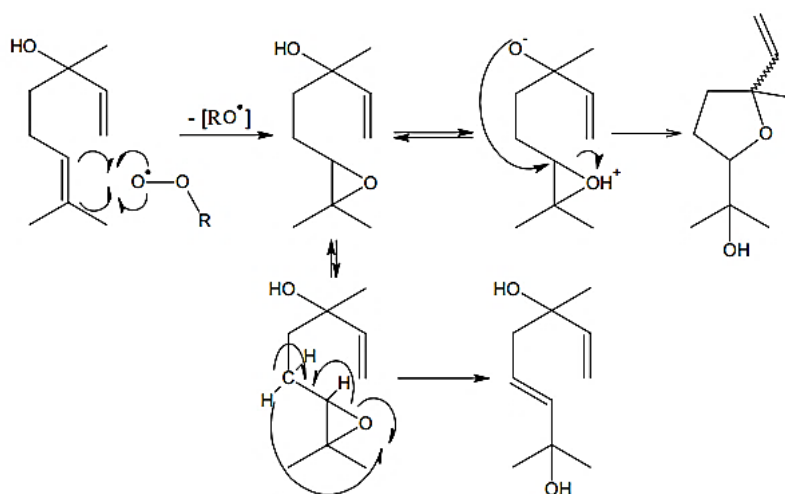


Figura 8 – Proposta de mecanismo para a auto-oxidação do linalol (Fonte: SPEZIALI, 2008).

A biossíntese dos terpenóides pode ocorrer através de duas rotas diferentes. Uma é oriunda da via do mevalonato (MVA), que se forma a partir do ácido acético. A segunda, que teve a sequência de reações caracterizada a partir da década de 90, é formada a partir do

piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato, através da rota do metileritritol-4-fosfato (MEP) (UMLAUF et al., 2004; OOTANI et al., 2013) (Figura 9).

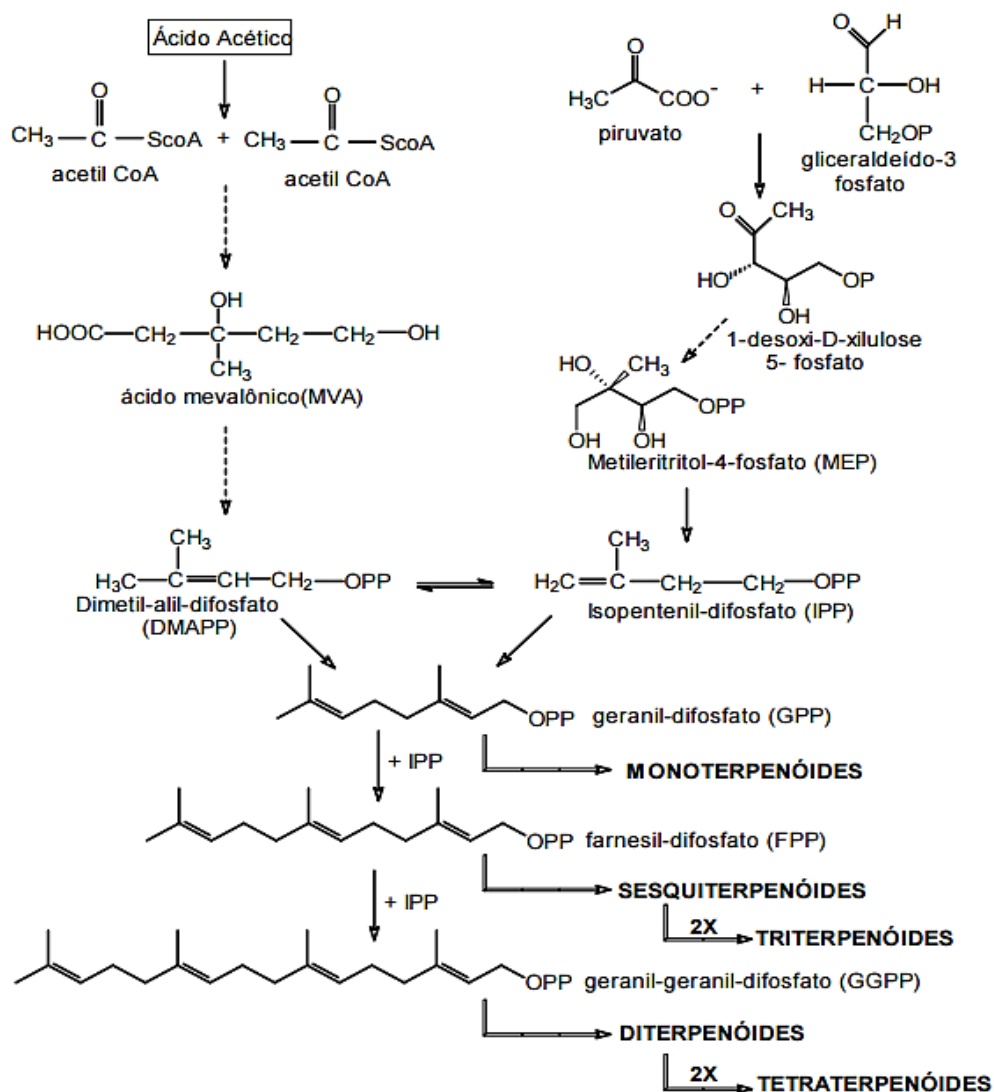


Figura 9 – Representação da biossíntese dos terpenóides. (Fonte: WAGNER, 1993; HÄNSEL et al., 1999).

II.3.1.3 Esteroides vegetais

Os esteroides extraídos de espécies vegetais, sendo os mais comuns o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol, possuem esqueleto carbônico formado pelo anel ciclopentanoperidrofenantrenico onde podem ser encontradas duplas ligações, principalmente na posição C-5 (MARANGONI; POLI, 2010) (Figura 10). O β -sitosterol apresenta uma estrutura semelhante ao colesterol, diferindo pela presença de um grupo etila na posição de carbono 24 da cadeia lateral (PEGEL, 1997).

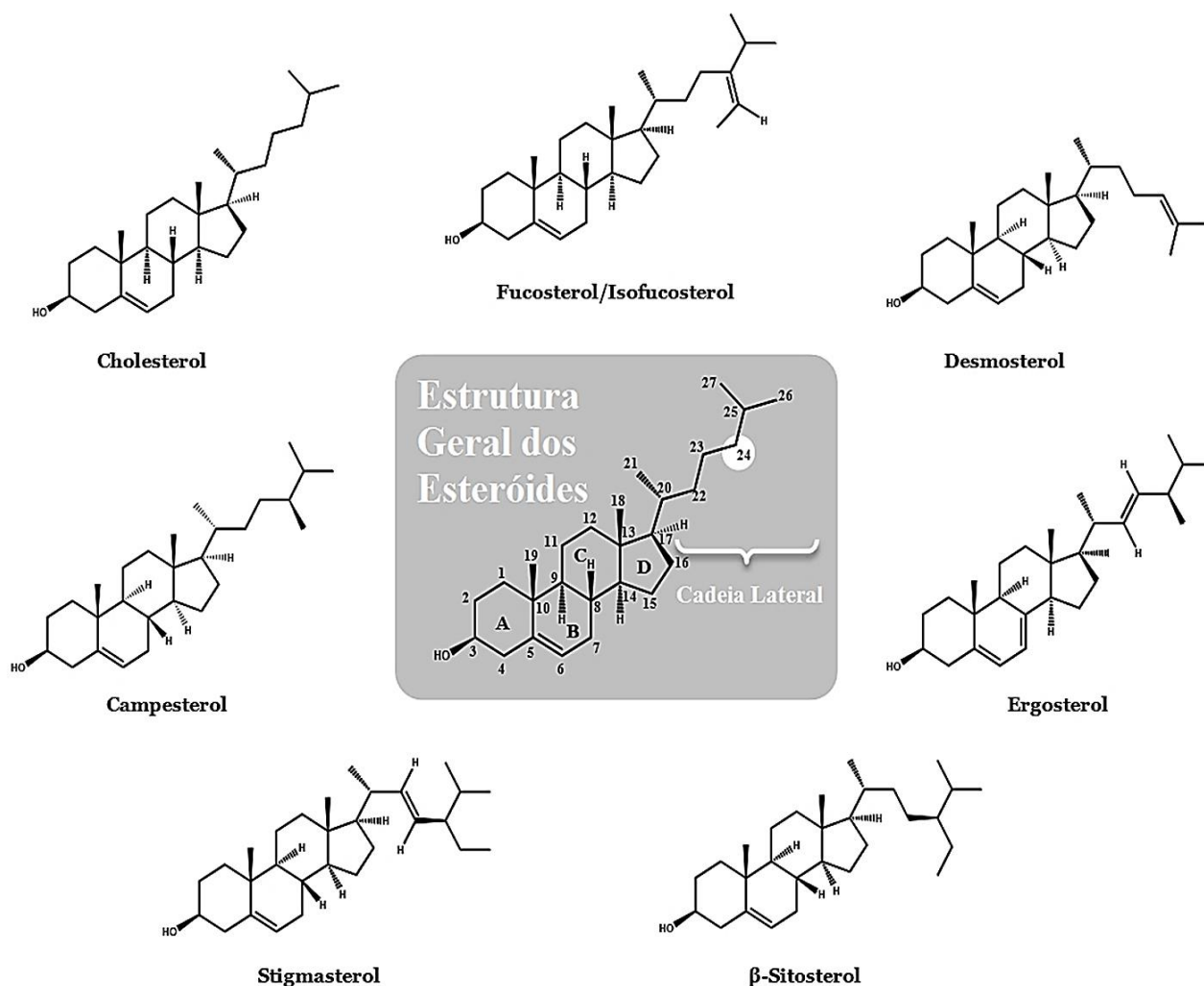


Figura 10 – Estrutura geral dos esteroides vegetais e as estruturas químicas dos esteróis mais comuns encontrados (Adaptado de LOPES et al., 2013).

A maioria dos estudos sobre esteróis vegetais têm-se centrado na capacidade de redução do colesterol, porém estudos anteriores tem demonstrado que os esteróis vegetais possuem vários outros benefícios para a saúde como capacidade antioxidante, anti-câncer, propriedades anti-inflamatórias, disfunções imunes, artrite reumática, hipercolesterolemia, câncer de mama e de cólon e hipertrofia benigna da próstata (GRAF, 1992; MOORADIAN, 1993; BOUIC et al., 1996; AWAD, GAN, FINK, 2000; LAW, 2000; AWAD, WILLIAMS, FINK 2001; AWAD, WILLIAMS, FINK 2003; WANG et al., 2002; YOSHIDA; NIKI 2003; KODURU et al., 2007; DARNET et al., 2011).

A biossíntese dos esteroides vegetais (Figura 11) ocorre pela união de duas moléculas de farnesildifosfato (FPP) (C15) unidas cauda-cauda para formar o esqualeno que sofre uma epoxidação catalisada por enzima gerando o esqualeno-2,3-óxido. A protonação do epóxido permite a abertura do anel para formar um cátion terciário, que sofre adição da ligação dupla C6–C7 formando um anel de seis membros e um novo cátion terciário. Através de novas adições das ligações duplas ocorrem ciclizações com formação de três anéis de seis membros

e um anel de cinco membros gerando o cátion terciário protosteril que, em plantas, pode formar um anel ciclopropano através da perda de um próton da metila ligada em C10 originando o cicloartenol ou, em animais e fungos, o alceno lanosterol pela perda de um próton (DEWICK, 2002).

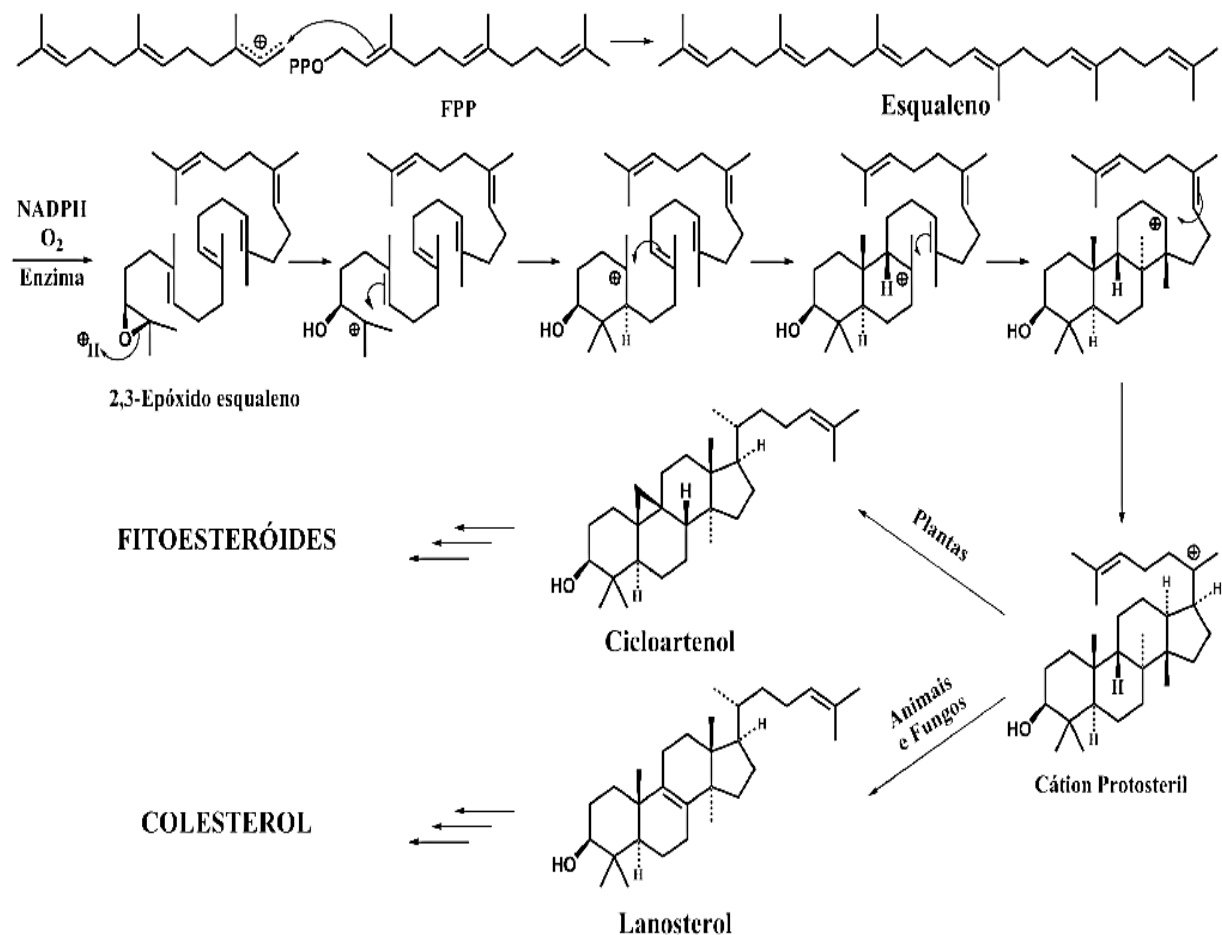


Figura 11 – Biossíntese de esteróides a partir do esqualeno. (Fonte: DEWICK, 2002).

Os esteroides vegetais, tais como o β -sitosterol, estão presentes nos extratos das plantas e vários estudos têm mostrado que estes podem apresentar propriedades antioxidantes. O β -sitosterol podem suprimir os radicais gerados, doando seu átomo de hidrogênio, gerando um radical antioxidante que é estabilizado por ressonância e torna-se reativamente fraco, por consequência, a taxa de propagação da oxidação é diminuída. (MOORADIAN, 1993; WANG et al., 2002; TAKEOKA; DAO, 2003; KODURU et al., 2007; ALADEDUNYE; PRZYBYLSKI, 2012; SINGH, 2013; JORGE et al., 2016).

II.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

A extração é o passo mais importante na determinação de compostos com capacidade antioxidante. Diversos métodos têm sido empregados para a extração desses compostos em

matrizes vegetais. No entanto, quando o objetivo principal é a quantificação desses compostos e/ou a determinação de sua capacidade antioxidante, a extração utilizando solventes orgânicos ainda é o método mais empregado.

Segundo Cowan, (1999) a eficiência da extração depende principalmente da escolha do solvente. A polaridade do composto alvo é o fator mais importante nessa decisão. Afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, utilização de co-solvente, e viabilidade financeira também devem ser considerados na seleção do solvente para extração de compostos antioxidantes. Metanol e misturas de metanol/água são os solventes mais utilizados para extração de substâncias fenólicas. A adição de água ao solvente contribui para criar um meio moderadamente polar, favorecendo a extração (LAPORNIK et al., 2005; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005).

II.5 TESTES FITOQUÍMICOS

Os testes fitoquímicos são considerados mais precisamente como um estudo preliminar sobre a química de uma planta. Sem chegar a detalhes, os testes procuram sistematizar, ou melhor, rastrear os principais grupos de substâncias que compõem um extrato vegetal. É um exame rápido através de reagentes de coloração ou precipitação que irão revelar a presença ou não de metabólitos secundários em um extrato vegetal (DE BESSA et al., 2013).

A aplicação do teste fitoquímico se faz necessária no caso de misturas muito complexas como costumam ser, muitas vezes, os extratos de plantas. É também útil no exame preliminar destes extratos como método de prospecção dos constituintes mais abundantes ou mais facilmente caracterizáveis (SHARANABASAPPA, et al., 2007).

II.5.1 Testes para terpenoides: Salkowski

O teste para identificação de terpenóides (reação de Salkowski) consiste no tratamento da amostra com clorofórmio e algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado, quando positivo nota-se o aparecimento de uma coloração castanho avermelhado na interface devido à desidratação da molécula em presença de ácido sulfúrico concentrado (AYOOLA et al., 2008).

II.5.2 Testes para esteróis: Liebermann- Burchard

O teste fitoquímico de Liebermann- Burchard consiste no tratamento da amostra com anidrido acético em presença e algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado, ocorrendo à

desidratação seguida de oxidação do sistema de anéis do ciclopentanoperidrofenantreno formando um esteroide aromático (Figura 12) que é evidenciado pelo aparecimento de uma coloração esverdeada (XIONG; WILSON; PANG, 2007).

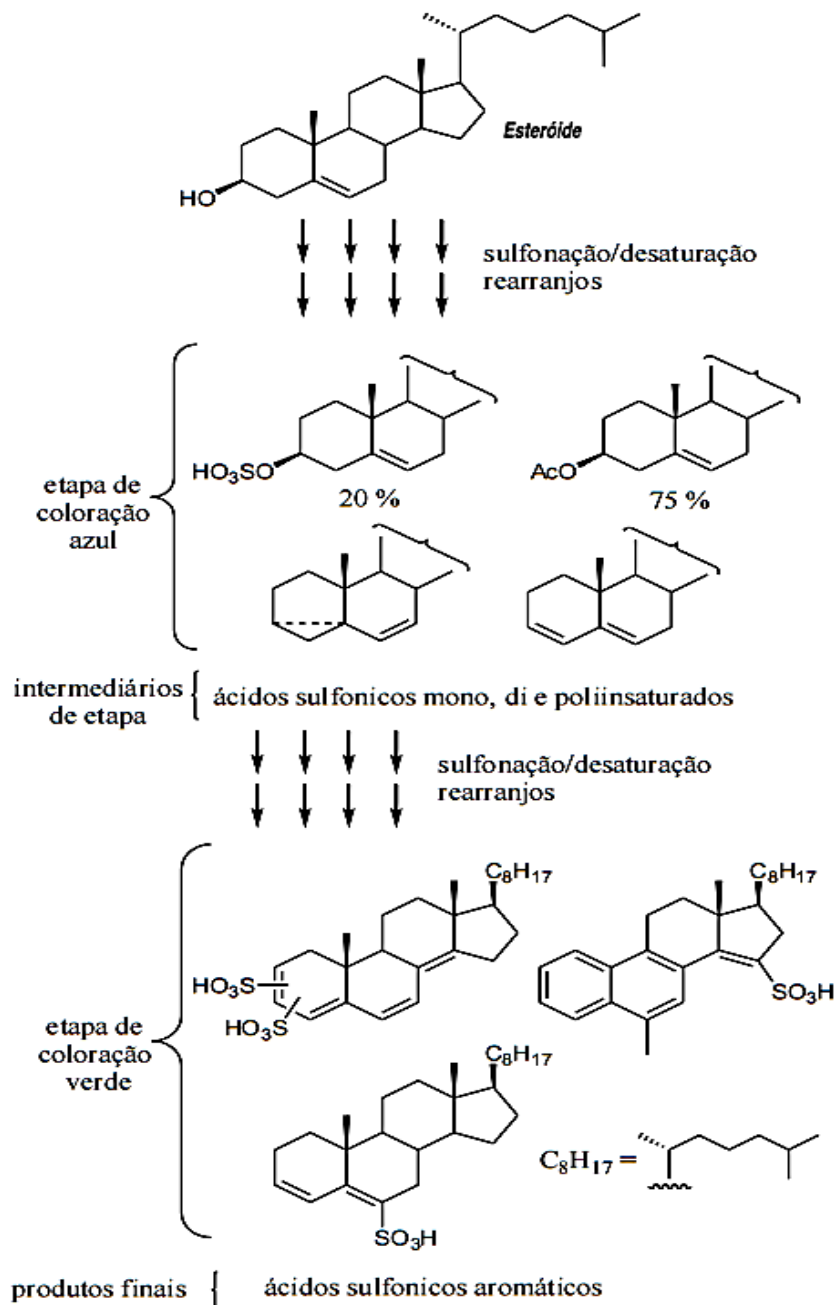


Figura 12 – Mecanismo da reação de Liebermann- Burchard. (Fonte: XIONG; WILSON; PANG, 2007).

II.5.3 Testes para compostos fenólicos: Folin-Ciocalteu

O teste de compostos fenólicos consiste na desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions (neste caso, carboxilado).

A partir daí, ocorre uma reação de oxi-redução entre o ânion e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, sofre redução e o meio reacional muda a coloração amarela para azul (Figura 13) (ROESLER et al., 2007).

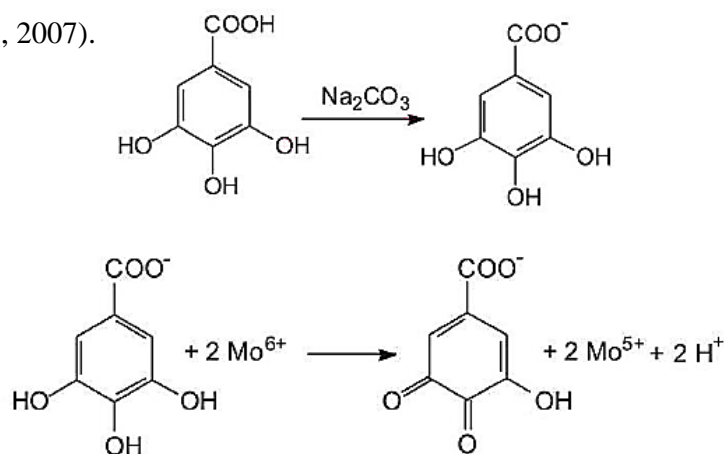


Figura 13 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu. (Fonte: OLIVEIRA et al., 2009).

II.6 TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.

II.6.1 Extração em fase sólida (SPE- Solid Phase Extraction)

A extração em fase sólida utiliza uma coluna contendo um sorvente apropriado para adsorver o analito que é então eluído com solvente específico. A SPE envolve etapas de condicionamento do cartucho com o solvente adequado para disponibilizar os sítios ativos e para ajustar as forças dos solventes de eluição com o solvente da amostra, extração dos analitos da amostra, lavagem do cartucho para eliminar possíveis interferentes e eluição dos analitos de interesse para posterior análise (Figura 14) (SILVA; COLLINS, 2011).

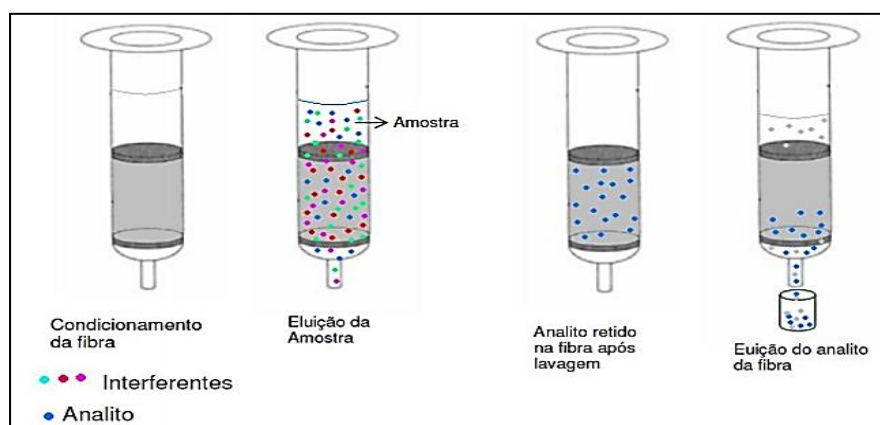


Figura 14 - Etapas do procedimento de Extração em Fase Sólida (SPE). (Fonte: EMAN 2008).

Apesar desta técnica requer equipamento de maior complexidade, apresenta vantagens comparativamente à extração sólido-líquido por requerer menos solvente e, possibilitar um maior grau de automação, a operação é mais rápida (2-5 minutos). Para além de funcionar como método de extração esta técnica também pode funcionar como meio de purificação da amostra, permitindo a sua pré-concentração o que proporciona melhores resultados na quantificação (CAVALIERE et al., 2006).

II.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatograph)

A cromatografia é um método físico-químico de separação contendo uma fase móvel e uma estacionária, onde a amostra a ser analisada é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente fazendo com que a amostra migre de acordo com as interações e as propriedades físico-químicas da fase móvel e da estacionária. Outro lado da coluna é instalado um detector que transmite para um registrador um sinal que é interpretado em forma de cromatogramas, sendo a área e a altura deste proporcional a concentração do analito (JIN et al., 2008).

O esquema de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência é esquematizado na Figura 15.

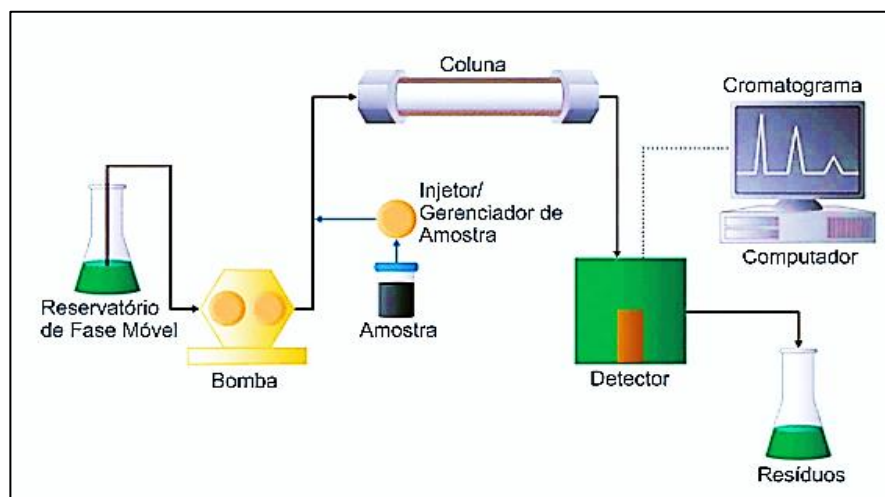


Figura 15 - Esquema dos componentes e funcionamento do HPLC.

(Fonte: WATERS, 2016).

A técnica de HPLC é um sistema muito eficiente para separar as misturas complexas de plantas. Métodos de cromatografia líquida têm sido relatados para a determinação de substâncias e para monitorizar a variação na composição de amostras (CARDOSO, 2002).

II.6.3 Técnicas hífenadas e métodos espectrométricos: ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM).

O desenvolvimento das técnicas cromatográficas hífenadas possibilita identificar os constituintes de extrato vegetal, sem que seja necessário isolar as substâncias (COLLINS et al., 2006). O termo técnicas hífenadas refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia (RODRIGUES et al., 2006).

As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações diferentes, ou seja, serem ortogonais. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com técnicas espectroscópicas como espectrofotômetro de UV-Vis, ressonância magnética nuclear (RMN) e também espectrômetro de massas (EM), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores. A escolha do detector torna-se fundamental quando o analito se encontra em nível de traços, necessitando de baixos limites de detecção (LANÇAS, 2009).

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. J.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALADEDUNYE, F.A.; PRZYBYLSKI, R. Frying performance of canola oil triacylglycerides as affected by vegetable oils minor components. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 89, pp. 41–53 2012.
- ALMAJANO, M.P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, A.L.; GORDON, M. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, p. 55-63, 2008.
- ANJO, Douglas Faria Corrêa. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular, **Jornal Vascular Brasileiro**, Jaraguá do Sul, v.(3)2; p. 145-154, 2004.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- ATOUI, A.K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry** V .89 p.27–36, 2005.
- AWAD, A.B., GAN, Y., FINK, C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Nutrition and Cancer**, 36: 74-78, 2000.

AWAD, A.B., WILLIAMS, H., FINK, C.S. Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Nutrition and Cancer**, 40: 157-164, 2001.

AWAD, WILLIAMS, H., FINK. Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells Eur. **Journal of Cancer Prevention**, 10: 507-513, 2003.

AYOOLA, G.A.; COKER, H.B.; ADESEGUN, S.A.; ADEPOJU-BELLO, A.A; OBAWEYA, K.; EZENNIA, E.C.; ATANGBAYILA, T.O. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, pp. 1019–1024, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.

BACKTORP, C.; Tobias, J. R.; Wass, J.; Panas, I.; Skold, M.; Borje, A.; Nyman, G. Theoretical Investigation of Linalool Oxidation. **The Journal of Physical Chemistry**, 10, 12204-12212, 2006.

BÄCHTOLD, G. Introdução aos antioxidantes. Radicais livres. Disponível em: <<https://radicaislivres97.wordpress.com/2013/05/26/introducao-aos-antioxidantes/>>, 2013. Acesso em: 15 dez. 2015.

BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their Spasmogenic Activity. **Pharmaceutical Biology**, 33 (1): 25-32, 1995.

BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição de Campinas**, Campinas, v.48, n. 2, p. 123-130, maio/ago, 1999.

BOUIC, et al. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. **International Journal of Immunopharmacology**., 18: 693-700, 1996.

BOTTERWECK, A.A.M., VERHAGEN, H., GOLDBOHN, R.A., KLEINJANS, J., BRANDT, P.A.V. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 38, p. 599-605 2000.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, 56: 317–333, 1998.

CAO, G.; VERDON, C.P.; WU, A.H.B., WANG, H., PRIOR, R.L. Automated Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity with COBAS FARA II. **Clinical Chemistry**, 41, 1738-1744, 1995.

CARDOSO, N. K. HONDA, A. BARISON. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.27, p.217, 2002.

CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 24, p. 134-142, 2006.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MARZIONI, F.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., **Journal of Chromatography A**, vol. 1135, no. 2, pp. 135–41, 2006.

CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O. Caracterização biométrica e respostas fisiológicas de diásporos de muricizeiro a tratamentos para superação da dormência. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.35, n.3, p. 704-712, set. 2013.

CELIK, S.; OZKAYA, A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 35, p. 547-552. 2002.

CHOI, H. S.; SONG, H. S; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v.48, p. 4156–4161, 2000.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564–582, 1999.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 456 p., 2006.

CORREA A, M. D.; VOZZO, J. A. *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Vol. 721). United States Department of Agriculture Forest Service, 2002.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43 p. 1603-1606, 2010.

DAHANUKAR, S.A., KULKARNI, R.A., REGE, N.N. Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian Journal Pharmacology**, v. 32, p. 81–118, 2000.

DARNET, S.; SERRA, J. L.; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L. H. M. "A high performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (Euterpe oleracea)." **Food Research International**, 44(7): 2107-2111, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd. Capítulo 5, 167-289. 2002.

DECKER, E.A. Antioxidant Mechanisms. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3^a Ed. Boca Raton, FL – USA: CRC Press. p. 475-492, 2008.

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

DE BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U; QUIRINO, M.S; CHAGAS JUNIOR, A. F; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde -Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15:692-707, 2013.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, 15: 1-5, 2010.

EMAN. European Mycotoxins Awareness Network. Sample Preparation Techniques for the Determination of Mycotoxins. 2008. Disponível em: <<http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?sectionid=3&mytype=training&number=2&fsid=61>> Acessado em: Janeiro de 2016.

FALCÃO, M. A.; CLEMENT, C. R. Fenologia e produtividade do Inga-cipó (*Inga edulis*) na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, 30 (2):173-180, 2000.

FATURI, C.B.; LEITE, J.R.; ALVES, P.B.; CANTON, A.C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 605-609, 2010.

FERNANDEZ-PANCHON, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M; GARCIA-PARRILLA. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 649-671, 2008.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**. 13, 435-448, 1992.

GRASSMAN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitamins Hormones**, 72: 505-535, 2005.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; COMAS-SERRA, F.; FEMENIA, A.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 506–514, 2015.

HÄNSEL, R.; STICHER, O.; STEINEGGER, E. **Pharmakognosie - Phytopharmazie**. 6. Aufl. Berlin: Springer, 1403 pp., 1999.

HÉRENT, M. F.; MAQUILLE, A.; SOUZA, J.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y.; JIWAN, J.L.H. **Identification and quantification of phenolic compounds in leaves of *Byrsonima crassifolia* by HPLC-HRMS**. In: 58th ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY, Salt Lake City, 2010.

HERRERA-RUIZ M.; ZAMILPA A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR M.; REYES-CHILPA R.; LEÓN E.; GARCÍA M.P.; TORTORIELLO J.; HUERTA-REYES M. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 14, p. 1255-1261, 2011.

HEMAMALINI, K.; ANARUG, B. Evaluation of phytochemical and pharmacological activity of methanolic extract of *Sophora interrupta*. **Indo American J Pharm Res**, 3(8), 6381-6390, 2013.

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

HOU, J.; LIA, W.; ZHENG, Q.; B, WANG, W.; XIAO, B.; XING, D. Effect of low light intensity on growth and accumulation of secondary metabolites in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 160-168, 2010.

JAYAPRAKASHA, G. K.; NEGI, P.S.; JENA, B.S.; RAO, J.M. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis** v.20, p.330–336, 2007.

JIN Y, XUE X, SHI H, XIAO Y, ZHANG F, LIANG X. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. **Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica** 10(1): 80 - 84, 2008.

JORGE, N.; SILVA, A. C.; ARANHA, C. P. M. Antioxidant activity of oils extracted from orange (*Citrus sinensis*) seeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** [online]. Vol. 88, n.2, pp.951-958, 2016.

KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n. 6, p. 453-64, 2004.

KARRE, Liz; LOPEZ, Keyla; GETTY, Kelly J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, p. 220–227, 2013.

KODURU, S., JIMOH, F. O., GRIERSON, D. S., AFOLAYAN, A. J. Antioxidant activity of two steroid alkaloids extracted from *Solanum aculeastrum*. **Journal of Pharmacology and Toxicology** 2(2), 160-167, 2007.

KULKARNI, S.; DE SANTOS, F. A.; KATTAMURI, S.; ROSSI, S. J.; BREWER, M. S. Effect of grape seed extract on oxidative, color and sensory stability of a pre-cooked, frozen, re-heated beef sausage model system. **Meat Science**, v. 88, p. 139-144, 2011.

LAW, M.R. Plant sterol and stanol margarines and health. **Western journal of medicine**, 173: 43-47, 2000.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extraction prepared from plants by- products using different solvent and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-501, 2005.

LANÇAS, F. M. “**Cromatografia Líquida Moderna**”, Editora Átomo, Campinas, 2009.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.93, n.1, p.47-56, 2005.

LOPES, G.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B. Sterols in algae and health. In: Hernández-Ledesma B, Herrero M, editors. **Bioactive Compounds from Marine Foods**. John Wiley & Sons. Ltd; p. 173-91, 2013.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; CAZARES LUNA, L.; MORENO GUTIÉRREZ, M.N. M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, 66: 79–82, 1999.

MacDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2046-2056, 2006.

MAIMONE, T.J.; BARAN P.S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 396-407, 2007.

MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 548-560, 2008.

MAGALHAES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 193-196, 2010.

MA, M. L.; SAIFUL, A. K.; SADEGH, M.; SRI, N. A. M. Phytochemical constituents, nutritional values, phenolics, flavonols, flavonoids, antioxidant and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruits. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14:152, 2014.

MOORADIAN, A.D. Antioxidant properties of steroids, **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 45(6),509-511, 1993.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 519-525, 2002.

MOON, J.K; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655-1666, Jan, 2009.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 93, n. 2, p. 257-66, 2005.

OU, B.; HAMPSCH, M. W.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 10, p.4619 – 26, 2001.

OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P.; COSTA, F.B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. 1. ed. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 2003, 64p.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRA, J. P. Use of Essential Oils in Agriculture. **Jornal de Biotecnologia e Biodiversidade**, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

PASTOR, V.; LUNA, E.; TON, J.; CERESO, M.; GARCÍA-AGUSTÍN, P; FLORS, V. Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-microbe interactions**, v. 26, p. 1334-1344, 2013.

PASTOR, V.; BALMER, A.; GAMIR, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B. Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

PICCINELLI, A.L.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.5863-5868, 2004.

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S.C.M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, p. 489-521, 2012.

PHILLIPS, M. A.; LEÓN, P.; BORONAT, A.; CONCEPCIÓN, M. R. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v.13, n.12, p. 619-23, 2008.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 10, 4290-4302, 2005.

RICHARDSON, J. E.; PENNINGTON, R. T.; PENNINGTON, T. D.; HOLLINGWORTH, P. M. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. **Science**, 293: 2242-2245, 2001.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TICKET, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruit. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams e Wilkins, 1996.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, n.1, p53-60, 2007.

RODRIGUES, M.V.N.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; JÚNIOR, S.B.; SANTOS, A.S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência: construindo a história dos produtos naturais**. vol. VII, 2006.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; COSTA, T. S. A. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

SANTOS, R.I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento, 5º ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.61, p.19-25, 2006.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C.R.P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L.C.; SANTOS, F. V.; SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima crassifolia* A. Juss. Leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 112: 319-326, 2007.

SAMPAIO, G. R.; SALDANHA, T.; SOARES, R. A. M.; TORRES, E. A. F. S. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1383-1390, 2012.

SANTOS, W. J. **Extração de compostos antioxidantes da folha de mangueira (*Mangifera indica* L.) utilizando CO₂ supercrítico, água e etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UNICAMP, Campinas - SP, 2013.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian Region. **Journal Food chemistry**, 101, 1012-1018, 2007a.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, 55: 381-387, 2007b.

SILVA, M.I.G.; SILVA, M.A.G.; AQUINO-NETO, M.R.N.; MOURA, B.A.; DE SOUSA, H.L.; DE LAVOR, E.P.H.; VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Effects of isopulegol on pentylenetetrazolinduced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SINGH, A. Sitosterol as an antioxidant in frying oils. **Food Chemistry**, 137, pp. 62–67, 2013.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, 18 (6): 1276-1280, 2007.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; RESS, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, 106: 331-339, 2008.

SHAHIDI, F; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.

SHARANABASAPPA, G.K; SANTOS, H.M.K, SHAILA, D.; SEETHARAM, Y.N.; SANJEEVARAO, I. Phytochemical Studies on *Bauhinia racemosa* Lam., *Bauhinia purpurea* Linn. and *Hardwickia binate* Roxb, **Journal of Chemistry**, 2007.

SHI, C.; CUI, J.; YIN, X.; LUO, Y.; ZHOU, Z. Grape seed and clove bud extracts as natural antioxidants in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during chilled storage: Effect on lipid and protein oxidation. **Food Control**, v. 40, p. 134-139, 2014.

SPEZIALI, M. G. **Síntese de produtos fragrantes através da oxidação catalítica de olefinas de origem natural**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2008.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBAN, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V.54, p.607-616, 2006.

SURVESWARAN, S., CAI, Y.Z., CORKE, H., SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry** V.102, p.938–953, 2007.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-9, 2012.

TAKEOKA, G.R. AND DAO, L.T. Antioxidant constituents of almond (*Pinus dulcis* Mill.) D.A. Webb) hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(2): 496-501, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4º ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 2004.

TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 7 (3): 1089-1099, 2008.

TANYILDIZI, S; SERVI, K; CIFTCI, U. Protective effects of d-limonene and linalool on female rats intoxicated with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 160, ed. 5, p. 221-225, 2009.

TERMENTZI, A., KEFALAS, P., KOKKALOU, E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. **Food Chemistry** V.98, p.599–608, 2006.

UMLAUF, D.; ZAPP, J.; BECKER, H.; ADAM, K. P. Biosynthesis of the irregular monoterpene artemisia ketone, the sesquiterpene germacrene D and other isoprenoids in *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2463-2470, 2004.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F; MOURA, J.B.F; MANFREDINE, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de danos oxidativos em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASCONCELOS, T. B. ; CARDOSO, A. R. N. R. ; JOSINO, J. B. ; MACENA, R. H. M. ; BASTOS, V. P. D. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde** , v. 16, p. 213-219, 2014.

VIVACONS, M.; MORENO, J.J. Beta-sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biology and Medicine** 39, 91-97, 2005.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. **Lipids**, v.42, p.87–96, 2007.

WAGNER, H. **Pharmazeutische Biologie**. 5. Auflage, New York: Gustav Fischer Verlag, 522pp., 1993.

WANG, T.; HICKS, K.B.; MOREAU, R. Phytosterols, triterpene alcohols, and phospholipids in seed oil from white lupin, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 79(12), 1201-1205, 2002.

WATERS. Sobre o processo de separação cromatográfica. Site da Waters Corporation, 2016. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-HighPerformance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055>. Acesso em: 26 jan. 2016.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 49, 277-280, 2003.

CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 MATERIA PRIMA: COLETA E IDENTIFICAÇÃO

As folhas da *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* utilizadas neste estudo foram coletadas e identificadas. As coletas foram realizadas em Belém-Pará e a identificação feita no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, pelo método de comparação de exsiccatas depositadas no banco de dados com número de registro para a *Byrsonima crassifolia* (220955) e *Inga edulis* (220956).

III.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

III.2.1 Preparo das amostras e extração dos compostos

As folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* foram selecionadas, lavadas duas vezes com água corrente para remoção de poeira, material estranho e secas em estufa industrial com circulação de ar forçado a 60 °C por 8 horas. Foram moídas em moinho industrial para alcançar partículas com granulometria de 0,3 a 1,0 mm. A matéria-prima foi armazenada ao abrigo da luz, a temperatura de 4 °C até a extração dos compostos bioativos (SILVA, ROGEZ; LARONDELLE, 2007b).

As folhas trituradas foram submetidas a um processo de extração sólido-líquido utilizando três sistemas sequenciais de solventes com polaridade diferentes, seguindo procedimento proposto por Pozo-Insfran et al (2004), Pellegrini et al. (2007) e Pompeu et al. (2009). A extração foi realizada com três sistemas sequenciais de solvente com polaridade crescente: acetato de etila, metanol e solução hidrometanólica (1:1 v:v). Para a sequência de extração (Figura 16) foi primeiramente utilizado acetato de etila. As extrações foram realizadas a temperatura ambiente, durante 1 h e na proporção de 1:6 (massa : volume) de planta seca e solvente, sendo extraídas duas vezes cada sistema de solvente (NACZK; SHAHID, 2004). O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro e o resíduo foi macerado nas mesmas condições com o mesmo solvente, os extratos obtidos foram misturados. Este mesmo procedimento foi realizado para o metanol e para solução hidrometanólica.

O processo resultou nos seguintes extratos: acetato de etila (EAE), metanólico (EM) e hidrometanólico (EHM). Para obtenção do extrato bruto foi misturada a metade de cada fração obtida individualmente, sendo em seguida concentrado em rotavapor à 40°C, e armazenado sob refrigeração -18°C até o momento das análises. O rendimento da extração foi expresso em miligrama de extrato seco por grama de matéria-prima seca (mg ES /g MPS). As frações (I) e (II) correspondem a metade dos extratos após a homogeneização de cada etapa de extração.

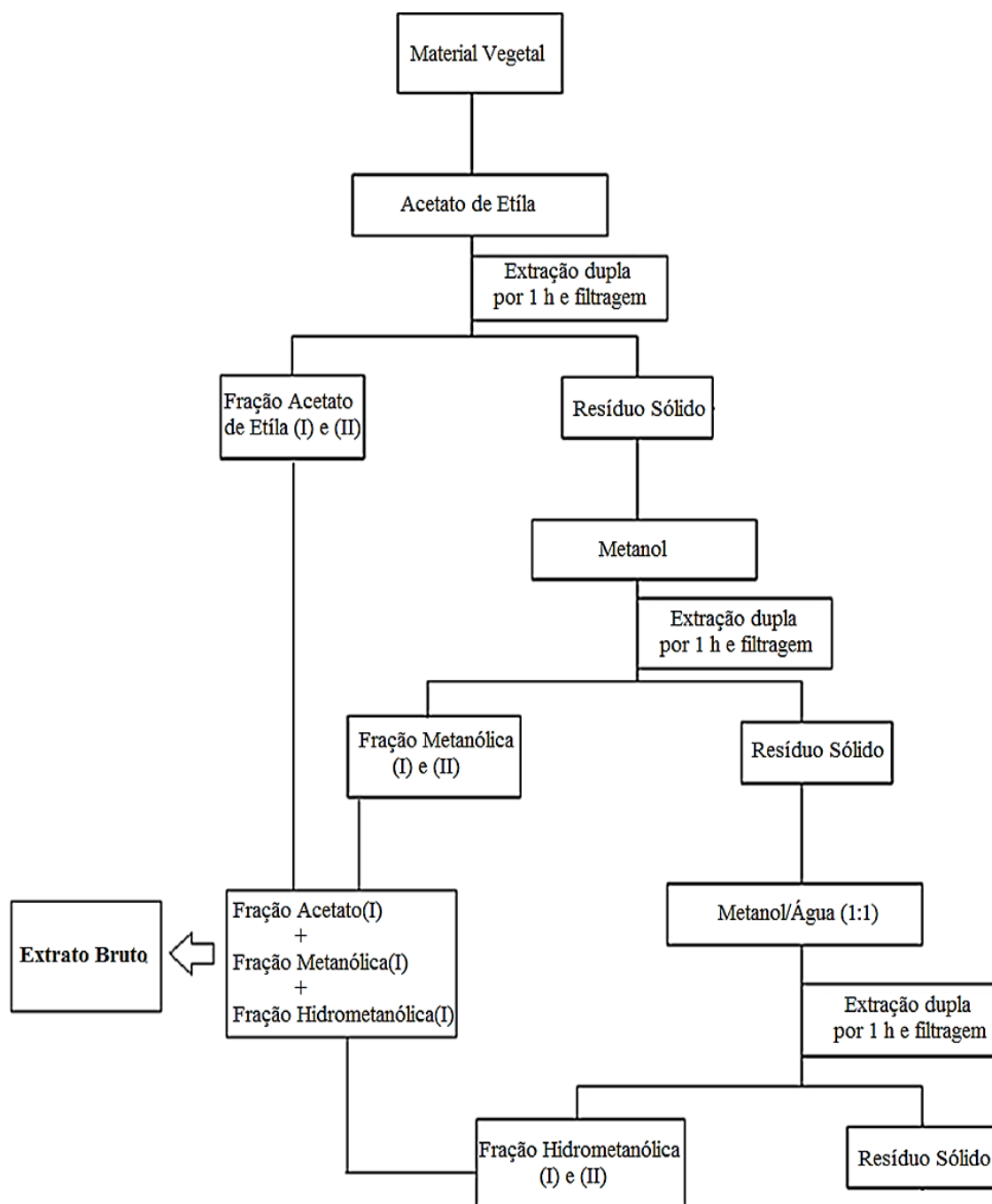


Figura 16- Fluxograma de obtenção dos metabólitos secundários.

(Fonte: Adaptação de CAVALCANTE, 2011).

III.2.2 Testes fitoquímicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários

Os extratos e frações foram submetidos a testes fitoquímicos de acordo com as classes de metabólitos secundários. Foram realizados testes para a identificação de esteroides através

da reação Liebermann-Burchard, seguindo a metodologia descrita por Joshi et al. (2013) e para a identificação qualitativa dos terpenóides realizou-se o teste de Salkowski através da metodologia descrita Ayoola et al. (2008). Para compostos fenólicos, através da reação com Folin Ciocalteu, seguindo a metodologia adaptada descrita por Singleton et al., 1999.

- **Teste de Lieberman-Burchard:** consistiu em transferir 10 ml dos extratos e/ou frações para um cadinho de porcelana, este sistema foi aquecido até a evaporação completa do solvente. Os resíduos obtidos foram ressuspensos em 2 ml de clorofórmio (CHCl_3), em seguida foram transferidos para tubos de ensaio e adicionou-se 1 ml de anidrido acético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$), agitando suavemente, e acrescentou-se cuidadosamente 1 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) ao longo dos lados do tubo de ensaio. Se a camada superior se torna verde, mostra a presença de esteroides, enquanto que se houve a formação de cor vermelho escuro indica a presença de triterpenóides.
- **Teste de Salkowski:** consistiu em transferir 10 ml dos extratos e/ou frações para cadinhos de porcelana, este sistema foi aquecido até a evaporação completa do solvente. Os resíduos obtidos foram ressuspensos em 2 ml de clorofórmio (CHCl_3), em seguida foram transferidos para tubos de ensaio acrescentando-se cuidadosamente 3 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado ao longo das paredes do tubo. Uma coloração castanha avermelhada na interface indica a presença de terpenoides.
- **Teste de Folin Ciocalteu:** consistiu em transferir 2 ml dos extratos e/ou frações para tubos de ensaio, adicionou-se 1 ml de solução de Folin Ciocalteu 1N, 5 ml de solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 75g/L. O aparecimento da coloração azul após o período de reação caracteriza a presença de compostos fenólicos.

*III.2.3 Avaliação do teor total de polifenóis, esteroides, terpenoides e da capacidade antioxidante do extrato bruto das folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*.*

III.2.3.1 Teor de polifenóis totais

Para a dosagem do teor de polifenóis totais foi utilizada a método colorimétrico de Folin-Ciocateu (SINGLETON, ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

A mistura reacional foi composta de 500 μL do extrato, 250 μL de solução de Folin-Ciocalteu 1N (Sigma Chemicals Co. - St. Louis, EUA) e 1250 μL de solução aquosa de

carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 75 g/L. Esta mistura foi armazenada e protegida da luz por 30 minutos à temperatura ambiente, e a absorbância lida a 750 nm no UV-Visível (T80+ UV-Vis Spectrophotometer). Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados de polifenóis totais foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina (Sigma Chemicals Co. – St. Louis, EUA) por grama de extrato seco (mg EQ /g ES). Todas as análises foram feitas em triplicatas sendo refeitas aquelas que apresentaram um coeficiente de variação maior ou igual a 12%.

III.2.3.2 Teor de esteroides totais

O teor de esteroides vegetais total foi determinado pelo método proposto por Sabir et al. (2003). Para quantificar os esteroides tomou-se 500 μL de cada extrato teste, em triplicata, adicionou-se 2 mL do reagente de Liebermann-Burchard e 1 mL de clorofórmio. Esta mistura foi armazenada e protegida da luz por 15 minutos à temperatura ambiente, e a absorbância lida a 640 nm. Utilizou-se o clorofórmio como branco. Os fitoesteróis totais foram calculados com base na curva padrão de β -sitosterol (Sigma-Aldrich) previamente gerado de acordo com o mesmo procedimento. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de β -sitosterol por grama de extrato seco (mg E β -sitosterol / g ES) determinado a partir da curva de calibração do padrão com concentrações variando de 0,02 - 0,10 mg/mL.

III.2.3.3 Teor de terpenóides totais

A quantificação dos terpenóides foi determinada pelo método de Ghorai et al., (2012). Para 1 mL do extrato vegetal, 3 mL de clorofórmio foi adicionado. A mistura amostra foi cuidadosamente agitada em vórtice e deixado durante 3 min e, em seguida, foram adicionados 200 μL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Em seguida, incubou-se à temperatura ambiente durante duas horas ao abrigo da luz, um precipitado castanho avermelhado foi formado. Em seguida, cuidadosamente, o sobrenadante da mistura de reação foi decantada, sem perturbar a precipitação. Adicionou-se 3 ml de metanol 95% (v / v) agitando-se cuidadosamente até a completa dissolução do precipitado em metanol. A absorbância foi lida a 538 nm, Utilizou-se o metanol 95% (v / v) como branco.

O teor total de terpenóide expressos como miligrama de equivalentes linalol (Sigma-Aldrich) por grama de extrato seco (mg EL / g ES), determinado a partir da curva de calibração do padrão do linalol com concentrações variando de 0,5 – 0,01 mg/mL a partir de

200 µL da solução de linalol previamente preparado em metanol 95% (vol / vol) e com a adição de 1,5 ml de clorofórmio e diluição em série com adição de metanol 95% (vol / vol).

III.2.3.4 Método ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio)

O método ORAC foi determinado conforme a metodologia descrita por Ou et al. (2001), Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Judith, Prior (2002) e Silva et al. (2007b) com algumas modificações. Fluoresceína (16,7 mg) (Sigma, St. Louis, MO) foi dissolvido em 10 mL de solução tampão de fosfato de potássio (75 mM, pH 7,4) para obter uma solução de estoque. A solução de trabalho (60 nM) foi obtida por diluição subsequente em solução tampão de fosfato de potássio. Uma solução de AAPH (2,2-azinobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto) de 10 mL, adquirido a partir de Wako Pure Chemical Industries (Orokawa, Japão), foi preparado a cada dia a uma concentração de 153 mM e mantidas em gelo antes da injeção automática.

As soluções de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma, St. Louis, MO) utilizadas para a curva de calibração (8, 16, 24, 32 e 40 µM) foram preparados cada dia após diluição em tampão de fosfato de potássio, uma solução de estoque 1 mM feita no mesmo solvente e armazenada a - 80 C. A análise foi realizada utilizando microplacas (96 poços, branco opaco, Greiner Bio-One, Wemmel, Bélgica) e um fluorímetro Synergy HTX (Biotek). A Amostra (25 µL) foi misturada com 250 µL de fluoresceína (60 nM) e incubou-se durante 10 min a 37 ° C na microplaca. Injetou-se automaticamente a solução de AAPH (25 µL) na microplaca. A fluorescência (λ excitação = 485 nm, 520 nm = λ emissão) foi registrada a cada minuto durante 50 min. Todas as amostras foram analisadas em três diluições e o valor médio foi feita para ORAC, tal como recomendado por Huang et al. (2002). A quantificação da capacidade antioxidante foi baseada no cálculo da área sob a curva (Equação 2), tal como proposto por Cao e Prior (1999). Os resultados foram expressos em µmole de equivalente Trolox por grama de extrato seco (µmol ET g⁻¹ de ES).

$$\text{ORAC} = \frac{[\text{ASC} - \text{ASC}^{\circ}]}{[\text{ASC}_{\text{referência}} - \text{ASC}^{\circ}]} \cdot f(\text{referência})$$

Equação (2)

Onde:

- ✓ ASC = área sob a curva na presença das amostras testadas, integradas entre o tempo zero e 80 minutos;
- ✓ ASC^o = Área sob a curva do controle (branco);
- ✓ ASC_{referência} = Área sob a curva para o composto de referencia (Trolox – 25 µM);

- ✓ f = fator de diluição, igual a razão entre o volume total de AAPH + fluoresceína e o volume da amostra;
- ✓ (referência) = concentração do composto referência (Trolox) em μm .

III.2.3.5 Atividade sequestrante do radical DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH foi determinada conforme proposto por Brand-Williams et al. (1995). O procedimento consiste em adicionar em uma cubeta 75 μL de amostra (apropriadamente diluída em metanol) e 2925 μL da solução metanólica de DPPH. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 515nm em diferentes intervalos de tempo até se manter constante. As leituras foram feitas em triplicata e o branco da análise utilizou-se MeOH ao invés da amostra. Os resultados foram expressos em micromoles de ET por grama de ES.

As atividades de seqüestro do radical de cada amostra foram calculadas de acordo com a porcentagem de inibição do radical DPPH (%Inb), segundo a Equação 3.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100$$

Equação (3)

Onde:

Ab = Absorbância do branco

Aa = Absorbância da amostra

O valor da atividade antioxidante é expresso em μM ET (Equivalentes Trolox) a partir do coeficiente de regressão calculado da curva de calibração, conforme a Equação 4.

$$\text{DPPH } (\mu\text{MET}) = \frac{\% \text{ Inibição}}{\text{Coeficiente}} \times \text{diluição}$$

Equação (4)

III.2.4 Preparo das amostras em SPE para análise em HPLC

As extrações foram realizadas a vácuo por meio da fixação dos cartuchos em sistema 12 portas Visiprep SPE coletor Supelco de vácuo (Supelco Park, Bellefonte, PA), em que existem 12 posições disponíveis para a realização de uma SPE simultaneamente.

III.2.4.1 Extração em fase sólida (SPE) para compostos fenólicos

Para os compostos fenólicos, as amostras foram submetidas à extração em fase sólida, utilizando a metodologia descrita por Dias et al., 2010 com adaptações utilizando cartucho SPE da Strata C18-E (Phenomenex) 55 μm , 200mg/3mL, previamente condicionada

com 10 ml de metanol e 10 ml de água ultrapura 1% ácido fórmico. 1 mL das frações concentradas, foram resolubilizadas em 5 mL de água ultrapura 1% ácido fórmico (solução A) (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição do procedimento SPE para compostos fenólicos.

Cartucho	C₁₈
Etapa	Método
1ª etapa (ativação do cartucho)	10 ml de MeOH e 10 ml de H ₂ O 1% ácido fórmico
2ª etapa (eluição da amostra)	1 ml da solução A
3ª etapa (clean-up)	5 ml de H ₂ O ultrapura
4ª etapa (secagem)	Secagem á vácuo
5ª etapa (eluição do analito)	10 ml de MeOH

III.2.5 Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, identificação e quantificação dos compostos bioativos

Para obtenção do perfil cromatográfico dos extratos utilizou-se um sistema UHPLC Thermo Scientific (EUA) equipado com bomba quaternária (LPG-3400RS), injetor automático (WPS-3000SL Analytical), utilizando como detector um sistema detector de arranjo de diodos-DAD (DAD-3000), software de leitura de dados (Chromoleon 7.1 SR2), célula de fluxo (Standard Analytical) e coluna Kinetex C18, 2,6µm, 100x4,6 mm (Phenomenex). A temperatura da coluna foi mantida em 30°C. Na análise foi empregado um sistema de eluição gradiente no modo reverso. Foram injetados 20 µL das amostras (filtradas em filtros de PVDF de 0,45 µm de porosidade e as fases móveis utilizadas foram água ultrapura com 1% de ácido fórmico (solução A) e acetonitrila com 1% ácido fórmico (solução B). Estas foram preparadas e filtradas com membranas de nylon (0,22 µm de porosidade) e submetidas ao banho ultrassônico por 15 minutos para degaseificação.

III.2.5.1 Condições analíticas do perfil cromatográfico para compostos fenólicos

O gradiente utilizado foi baseado em Dias et al., 2010, com as seguintes modificações: 3% B (0 a 13 minutos); 16% B (18 minutos); 16% B (24 minutos); 19% B (24,5 minutos); 22% B (26 minutos); 36% B (27 até 34 minutos); 90% B (39 até 40 minutos); 3,0% B (43 minutos). Foram utilizados os seguintes padrões para a identificação dos compostos presentes nos extratos: ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido ferrúlico, delphinidina, quercetina e miricetina.

A identificação e quantificação dos compostos nas matrizes foram realizadas através das comparações dos tempos de retenção e área formada com os padrões utilizados. Foi também realizada escolha de picos majoritários, não identificados pelos padrões utilizados, que foram quantificados através da área formada e relacionados a uma possível classe de fenólicos. Os resultados foram expressos em mgEM/gES (miligramas de equivalentes miricetina por grama de extrato seco) para *B. crassifolia* e em mgEQ/gES (miligramas de equivalentes quercetina por grama de extrato seco) para *I. edulis*.

Tabela 4 - Gradiente de eluição para compostos fenólico por HPLC.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0-13	97	3
18	84	16
24	84	16
24,5	81	19
26	78	22
27-34	64	36
39-40	10	90
43	97	3

III.2.5.2 Análise HPLC – ESI - HRMS

Todas as análises de HPLC-MS foram realizadas em um sistema de Accela juntamente com o espectrômetro de massa do híbrido LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). Para experiências HRMS, dados foram adquiridos no modo de íon negativo usando MS exame completo com um alcance em massa de 100-1500 m/z. O orbitrap operado em resolução 30000 (definição FWHM). Todos os dados experimentais foram adquiridos através da calibração externa diariamente antes da aquisição de dados. Apropriado de ajuste da fonte de íon electrospray foi feito com ácido elágico no m/z 300.99. Aplicaram-se as seguintes condições de admissão de electrospray: pulverizar a tensão, 5kV; taxa de fluxo de gás (N2) bainha, 35 u.a.; taxa de fluxo do gás auxiliar (N2), 10 u.a.; temperatura capilar, 275° C; tensão capilar, -19 V; tubo de lente, -200 V

III.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos são expressos como média ± desvio padrão (DP). Os coeficientes de correlação foram determinados no Microsoft Office Excell 2010.

REFERÊNCIAS

AYOOLA, G.A.; COKER, H.B.; ADESEGUN, S.A.; ADEPOJU-BELLO, A.A; OBAWEYA, K.; EZENNIA, E.C.; ATANGBAYILA, T.O. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, pp. 1019–1024, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, 299, 50–62, 1999.

CAVALCANTE, M.A. **Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas**. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Pará, UFPA, 2011.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, 15: 1-5, 2010.

GHORAI, N.; CHAKRABORTY, S.; GUCCHAIT, S.; SAHA, SK.; BISWAS, S. Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. **Nature protocol Exchange**, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M. F.; JUDITH, A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4437–4444, 2002.

JOSHI, A.; BHOBE, M.; SAATARKAR A. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, pp. 80–87, 2013.

KURŞAT, M.; YILMAZ, Ö.; EMRE, I.; CIVELEK, Ş.; GÖKÇE, Z. Some Biological Contents and Radical Scavenging Activities of Five *Artemisia* L. Species Growing in Turkey. **Journal of Drug Metabolism and Toxicology** 5:172, 2014.

LEE, J.; WEON, JB.; YUN, B-R.; EOM, MR.; MA, CJ. Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in *Artemisia apiacea* by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector. **Pharmacognosy Magazine**. 11(42):297-303, 2015.

LU, B.; ZHANG, Y.; WU, X.; SHI, J. Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultraperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 588(1): 50–63, 2007.

LUO, X.L; SHAO, Q; QU, H.B; CHENG Y.Y. Simple method for determination of five terpenoids from different parts of *Tripterygium wilfordii* and its preparations by HPLC

coupled with evaporative light scattering detection. **Journal of Separation Science** 30(9): 1284–1291, 2007.

NACZK, M.; SHAHID, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. v. 1054, p. 95-111, 2004.

OU, B.; HAMPSCH, M. W.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p.4619 – 26, 2001.

ONYEIKE, E. N.; IKEWUCHI, J. C.; IKEWUCHI, C. C.; UWAKWE, A. A. Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of simple terpenes, carotenoids, phytosterols and flavonoids in the leaves of *Acalypha wilkesiana* Muell Arg. **Pacific Journal of Science and Technology**, 11:480–7, 2010.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNNA, O.V.; SALVATORE, S.; BRENNNA, O.V.; GALAVERNA, G.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BENNET, R.N.; BRIGHENTI. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetables foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 87, 103-111, 2007.

PIÑEIRO, Z.; PALMA, M; BARROSO, C.G. Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, 513, 209–214, 2004.

POZO-INSFRAN, D., BRENES, C.H., TALCOTT, S.T (2004). Phytochemical composition and pigment stability of açai. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1539-1545, 2004.

POMPEU, D.; SILVA, E.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, 100, 6076-6082, 2009.

SABIR, S.M; HAYAT ,I.; GARDEZI, S.D.A. Estimation of sterols in edible fats and oils. **Pakistan Journal of Nutrition**, 2, 178–181, 2003.

SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R; LAMUELA – RAVENTOS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin- Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzimology**, 299: 152-178, 1999.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, 55: 381-387, 2007b.

SOUZA, J. N. S.; SILVA. E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, 18 (6): 1276-1280, 2007.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; RESS, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, 106: 331-339, 2008.

CAPÍTULO IV.

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES
DE FOLHAS DE *BYRSONIMA CRASSIFOLIA* E *INGA
EDULIS*.**

**Avaliação dos compostos antioxidantes de folhas de murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*)
e ingazeiro (*Inga edulis*)**

Artigo submetido à revista Química Nova
(configuração conforme normas da revista)

**Evaluation of antioxidant compounds from murucizeiro leaves (*Byrsonima crassifolia*)
and ingazeiro (*Inga edulis*)**

A Região Amazônica apresenta uma crescente busca por espécies vegetais que sintetizem compostos bioativos. Dentro desse contexto, o murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) e o ingazeiro (*Inga edulis*) destacam-se por apresentam elevados conteúdos fenólicos em extratos de suas folhas. Não obstante torna-se importante a avaliação de outros compostos antioxidantes presentes nestas matrizes amazônicas. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar e identificar os compostos com capacidade antioxidantes dessas duas matrizes vegetais amazônicas. Utilizou-se testes fitoquímicos para a identificação qualitativa dos compostos, método ORAC e DPPH para a determinação da capacidade antioxidante e Extração em Fase Sólida (SPE), para pré- concentração e pré-purificação dos extratos para a identificação e quantificação por HPLC. Os testes fitoquímicos confirmaram a presença de fitoesteróis, terpenoides e compostos fenólicos nas matrizes estudadas. Os extratos brutos e frações apresentaram capacidade antioxidante em maior ou menor nível através dos diferentes métodos, com destaque para as frações metanol. A fração metanol foi a que apresentou compostos com maior atividade antioxidante. Foram identificados e quantificados por HPLC o ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido ferrúlico, quercetina e miricetina.

Palavras-chave: Compostos antioxidantes. Espécies amazônicas. HPLC.

INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos com capacidade antioxidante têm despertado grande interesse devido principalmente às descobertas da ação deles sobre os radicais livres no organismo. Por outro lado, às formas de interações moleculares e mecanismos de bioatividade desses compostos ainda proporcionam um desafio para os cientistas (HEMAMALINI, ANARUG, 2013).

A utilização de antioxidantes sintéticos para prolongar a estabilidade dos produtos alimentícios durante processamento e estocagem é frequentemente utilizada na indústria,

entretanto estas substâncias vêm sendo relacionadas com efeitos danosos a saúde. Assim, a busca por antioxidantes de fontes naturais que possam substituir os sintéticos tem recebido muita atenção por parte do segmento industrial e acadêmico (DECKER, 2008; MATKOWSKI, 2008).

A região Amazônica, em função de sua enorme biodiversidade vegetal ainda pouco investigada, mostra-se como uma importante fonte de vegetais que apresentam elevados teores de compostos bioativos (SILVA et al., 2007a; SOUZA et al., 2007). Dentre as fontes vegetais destacam-se as espécies de *Byrsonima crassifolia* (muricizeiro) e de *Inga edulis* (ingazeiro) que apresentam elevados valores de capacidade antioxidante e de conteúdo fenólico em extratos de suas folhas em relação a outras plantas amazônicas (SILVA, ROGEZ, LARONDELLE, 2007b; SOUZA et al. 2008).

Entretanto, a busca por novos compostos responsáveis pela capacidade antioxidante, além dos compostos fenólicos nessas dessas matrizes vegetais, têm tido um intenso interesse de pesquisas. Assim, torna-se imprescindível verificar a presença de outras moléculas com propriedades antioxidantes, como por exemplo, os esteroides vegetais (fitoesteróis) e os terpenoides. Pois, pesquisas sugerem que fitoesteróis, tais como beta-sitosterol, é responsável em parte, pelos efeitos protetores contra as espécies reativas de oxigênio. De fato, os fitoesteróis apresentam potencial antioxidante e diversas funções a nível molecular, acredita-se que ele reduz o risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (VIVACONS; MORENO, 2005). Nas plantas, mais de 200 tipos diferentes de fitoesteróis têm sido relatados, sendo os mais abundantes β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (COSTA, 2010).

Outra importante classe são os terpenóides, tais como o linalol, que apresentam capacidade antioxidante (CARVALHO; FONSECA, 2006). Tanyildizi et al. (2009) evidenciaram o efeito antioxidante do linalol associado à diminuição da formação de malondialdeídos (MDA) na peroxidação lipídica induzida. Enquanto que, Celik e Oskaya (2002) demonstraram que o efeito inibitório da peroxidação lipídica atribuído ao linalol é comparável à do α -tocoferol e do ácido lipóico, podendo dessa forma proteger ácidos graxos insaturados, com perspectiva de uso em terapias complementares aos danos causados pelo estresse oxidativo.

Ao longo dos últimos anos, em função dos efeitos benéficos à saúde destes compostos, existe um grande interesse em quantificá-los em matrizes vegetais. O estudo destas plantas amazônicas, ricas em compostos bioativos, pode favorecer a descoberta de novos compostos e/ou novas fontes antioxidantes, fato que auxiliaria no desenvolvimento econômico e tecnológico da região. Assim, o trabalho tem como objetivo utilizar metodologia analítica

para identificação qualitativa e quantitativa destes compostos em matrizes vegetais amazônicas, avaliando a capacidade antioxidante dos extratos.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes químicos

Acetato de etila P.A (Êxodo Científica, Brasil), metanol P.A (Sigma Aldrich, Brasil), ácido sulfúrico concentrado P.A (Neon, Brasil), anidrido acético P.A (Merck, Alemanha), clorofórmio grau técnico, Metanol Grau HPLC (Sigma Aldrich, Brasil), ácido fórmico (Tedia, EUA), acetonitrila HPLC (Tedia, EUA), 2,2'-azinobis-amidinopropano dihidroclorato (AAPH) (Wako Pure Chemical Industries, Orokawa, Japão), fluoresceína, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-ácido carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e reagente Folin-Ciocalteu; padrões de quercetina (Sigma-Aldrich, EUA) , β -sitosterol e linalol (Sigma Aldrich, MO), ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido ferrúlico, delphinidina, quercetina e miricetina (Sigma-Aldrich). Acetonitrilo LC/MS e metanol LC/MS foram adquiridos a partir de Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands)

Materia - prima

As folhas da *B. crassifolia* e *I. edulis* utilizadas neste estudo foram coletadas em Belém-Pará e identificadas no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém-Pará), pelo método de comparação de exsiccatas depositadas no banco de dados com número de registro para a *B. crassifolia* (220955) e *I. edulis* (220956).

Preparo das amostras e extração de compostos

Pré-tratamento da matéria-prima

As folhas de *B. crassifolia* e *I. edulis* foram selecionadas, lavadas duas vezes com água corrente para remoção de poeira, material estranho e secas em estufa industrial com circulação de ar forçado a 60 °C por 8 horas. Foram moídas em moinho industrial para alcançar partículas com granulometria de 5 mm de granulometria. A matéria-prima foi armazenada ao abrigo da luz, a temperatura de 4 °C até a extração dos compostos bioativos. conforme metodologia utilizada por Cavalcante (2011)

Preparação dos extratos vegetais

As folhas trituradas foram submetidas a um processo de extração sólido-líquido, seguindo procedimento proposto por Pozo-Insfran et al (2004), Pellegrini et al. (2007) e Pompeu et al. (2009). A extração foi realizada com três sistemas sequenciais de solvente com polaridade crescente: acetato de etila, metanol e solução hidrometanólica (1:1 v:v). As extrações foram realizadas a temperatura de 28°C, durante 1h e na proporção de 1:6 (massa : volume) de

planta seca e solvente, sendo extraídas duas vezes cada sistema de solvente (NACZK; SHAHID, 2004). O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro e o resíduo foi macerado nas mesmas condições com o mesmo solvente, os extratos obtidos foram misturados.

O processo resultou nos seguintes extratos: acetato de etila (EAE), metanólico (EM) e hidrometanólico (EHM). Para obtenção do extrato bruto foi misturada a metade de cada fração obtida individualmente, sendo em seguida concentrado em rotaevaporador à 40°C, e armazenado sob refrigeração a -18°C até o momento das análises. O rendimento da extração foi expresso em miligrama de extrato seco por grama de matéria-prima seca (mg ES / g MPS).

Testes fitoquímicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários

Os extratos e frações foram submetidos a testes fitoquímicos de acordo com as classes de metabólitos secundários. Foram realizados testes para a identificação de esteroides através da reação Liebermann-Burchard, seguindo a metodologia descrita por Joshi et al. (2013) e para a identificação qualitativa dos terpenóides realizou-se o teste de Salkowski através da metodologia descrita Ayoola et al. (2008). Para compostos fenólicos, seguiu-se a reação com o reagente Folin-Ciocalteu, através da metodologia adaptada descrita por Singleton et al., 1999.

Determinação de fenólicos totais

Para a dosagem do teor de fenólicos totais foi utilizada a método colorimétrico de Folin-Ciocateu (SINGLETON, et al., 1999). Os resultados de polifenóis totais foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de extrato seco (mg EQ / g ES).

Determinação de esteroides totais

O teor de esteroides vegetais total foi determinado pelo método proposto por Sabir et al. (2003). Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de β -sitosterol por grama de extrato seco (mg E β -sitosterol /g ES).

Determinação de terpenoides totais

A quantificação dos terpenóides foi determinada pelo método de Ghorai et al., (2012). O teor total de terpenóide expressos como miligrama de equivalentes linalol por grama de extrato seco (mg EL / g ES).

Método ORAC (Capacidade de absorção o radical oxigênio)

O método ORAC foi determinado conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2007b). Os resultados foram expressos μ mol ET g-1 de ES.

Atividade sequestrante do radical DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH foi determinada conforme proposto por Brand-Williams et al. (1995). Os resultados foram expressos μ M ET.g-1 ES.

Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Extração em Fase Sólida (SPE) de compostos fenólicos

Os extratos foram submetidos à extração em fase sólida (*clean-up*), utilizando cartucho SPE Strata C18-E (Phenomenex) 55µm, 200mg/3mL, em sistema 12 portas Visiprep SPE coletor Supelco de vácuo (Supelco Park, Bellefonte, PA), utilizando a metodologia descrita por Dias et al., 2010 com adaptações, foram utilizados 1 mL da solução (200 µL do extrato e 800 µL de água ultrapura) por cartucho, os quais foram previamente condicionados com 10 ml de metanol com 1% ácido fórmico e 10 ml de água ultrapura 1% ácido fórmico. O *clean-up* foi realizado com 5 ml água ultrapura, e a eluição final foi realizada com 20 ml de metanol.

Análises cromatográficas

Para obtenção do perfil cromatográfico dos extratos utilizou-se um sistema UHPLC Thermo Scientific (EUA) equipado com bomba quaternária (LPG-3400RS), injetor automático (WPS-3000SL Analytical), utilizando como detector um sistema detector de arranjo de diodos-DAD (DAD-3000), software de leitura de dados (Chromoleon 7.1 SR2), célula de fluxo (Standard Analytical) e coluna Kinetex C18, 2,6µm, 100x4,6 mm (Phenomenex). A temperatura da coluna foi mantida em 30°C. Na análise foi empregado um sistema de eluição gradiente no modo reverso. Foram injetados 20 µL das amostras (filtradas em filtros de PVDF de 0,45 µm de porosidade e as fases móveis utilizadas foram água ultrapura com 1% de ácido fórmico (solução A) e acetonitrila com 1% ácido fórmico (solução B). Estas foram preparadas e filtradas com membranas de nylon (0,22 µm de porosidade) e submetidas ao banho ultrassônico por 15 minutos para degaseificação.

O gradiente utilizado foi baseado em Dias et al., 2010, com as seguintes modificações: 3% B (0 a 13 minutos); 16% B (18 minutos); 16% B (24 minutos); 19% B (24,5 minutos); 22% B (26 minutos); 36% B (27 até 34 minutos); 90% B (39 até 40 minutos); 3,0% B (43 minutos).

Foram utilizados os seguintes padrões para a identificação dos compostos presentes nos extratos: ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido ferrúlico, delphinidina, quercetina e miricetina.

A identificação e quantificação dos compostos nas matrizes foram realizadas através das comparações dos tempos de retenção e área formada com os padrões utilizados. Foi também realizada escolha de picos majoritários, não identificados pelos padrões utilizados, que foram quantificados através da área formada e relacionados a uma possível classe de fenólicos. Os resultados foram expressos em mgEM/gES (miligramas de equivalentes miricetina por grama de extrato seco) para *B. crassifolia* e em mgEQ/gES (miligramas de equivalentes quercetina por grama de extrato seco) para *I. edulis*.

Análise HPLC- ESI- HRMS

Todas as análises de HPLC-MS foram realizadas em um sistema de Accela juntamente com o espectrômetro de massa do híbrido LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). Para experiências HRMS, dados foram adquiridos no modo de íon negativo usando MS exame completo com um alcance em massa de 100-1500 m/z. O orbitrap operado em resolução 30000 (definição FWHM). Todos os dados experimentais foram adquiridos através da calibração externa diariamente antes da aquisição de dados. Ajuste da fonte de íon electrospray foi feito com ácido elágico no m/z 300.99. Aplicaram-se as seguintes condições de admissão de electrospray: pulverizar a tensão, 5kV; taxa de fluxo de gás (N₂) bainha, 35 u.a.; taxa de fluxo do gás auxiliar (N₂), 10 u.a.; temperatura capilar, 275° C; tensão capilar, -19 V; tubo de lente, -200 V

Análise estatística

Os dados obtidos são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os coeficientes de correlação foram determinados no Microsoft Office Excell 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento dos extratos

A Figura 1 apresenta os resultados dos rendimentos dos extratos brutos e frações das espécies vegetais *B. crassifolia* e *I. edulis*

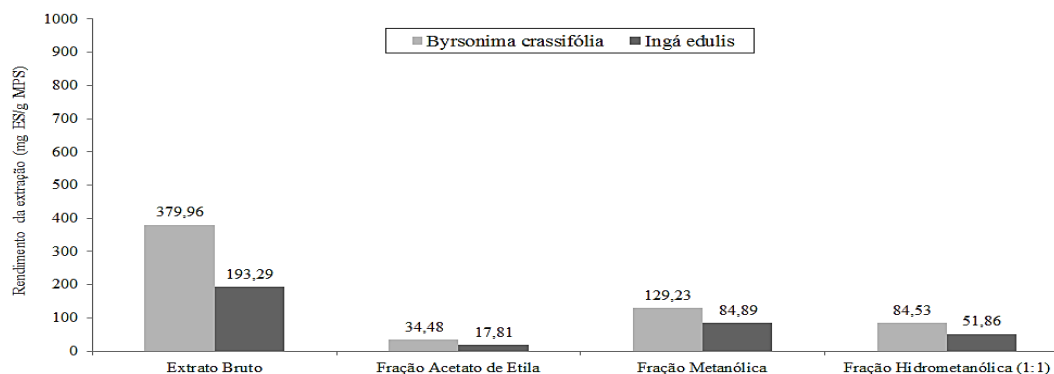


Figura 1- Rendimento dos extratos brutos e das frações de folhas de *B. crassifolia* e *I. edulis*, expressos em miligrama de extrato seco por grama de matéria prima seca (mg ES/g MPS).

O rendimento da extração é influenciado por diversos fatores tais como: solvente utilizado, método de extração aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes, tamanho de partícula do material vegetal, as condições de tempo e temperatura e a presença de compostos interferentes (CAO; PRIOR, 1999; YILMAZ; TOLEDO, 2006). Assim o rendimento obtido durante a etapa de extração, variando de 34,48 (3,4%) a 379,96 (37,9%) mg ES/g MPS para a *B. crassifolia* e 17,81 (1,7%) a 193,29 (19,3%) para o *I. edulis*. Observa-

se que a fração acetato de etila apresenta menor rendimento em comparação com as demais frações isso pode ser justificado, pois solventes tais como acetona, acetato de etila geralmente promovem baixos rendimentos (NOUR et al., 2014).

Testes fitoquímicos

A análise fitoquímica dos extratos bruto e/ou frações de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*, revelou a presença de metabólitos secundários tais como: esteroides, terpenoides e compostos fenólicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados dos testes fitoquímicos nas folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*.

Teste fitoquímico	<i>Byrsonima crassifolia</i>				<i>Inga edulis</i>				Controle		
	EB	FAE	FM	FHM	EB	FAE	FM	FHM	C _E	C _T	C _{CF}
Liebermann-Burchard	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Salkowski	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
Folin Ciocalteu	(++)	(+)	(+++)	(+++)	(+)	(+)	(++)	(++)	-	-	+

EB = Extrato Bruto; FAE. = Fração Acetato de etila; FM = Fração Metanol; FHM = Fração Hidrometanólica (1:1); C_E = Controle esteroides; C_T = Controle terpenoides; C_{CF} = Controle compostos fenólicos. O sinal “+” indica presença e “-” ausência do constituinte químico. Fortemente Positivo = (+++), Moderadamente Positivo = (++) , Positivo = (+)

A reação de Liebermann-Burchard revelou a presença de esteróis livres pela formação da coloração verde na fração acetato de etila da *Byrsonima crassifolia* após adição de anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado, coincidindo com os resultados obtidos por Lorenzi et al., (2006) quando analisaram a fração acetado de etila de folhas de *Byrsonima coccolobifolia*. No estudo, a fração metanolica do *Inga edulis* evidenciou-se a presença de substâncias com natureza esteroidal ou esteróis livres utilizando o reagente Liebermann-Burchard o mesmo foi observado por Alvarez et al., (1998) para o *Inga marginata*. Isso ocorre porque os esteróides são compostos apolares, podendo aparecer, portanto, em solventes apolares, em menor quantidade, em solventes de polaridade alta ou intermediária (YUNES; CALIXTO, 2001).

A reação de Salkowski para identificação colorimétrica de terpenóides, quando positiva, ocorre à formação de coloração castanho avermelhado na interface (AYOOLA et al. 2008). Isso foi observado para as frações metanolicas para as espécies amazônicas do estudo.

Os compostos fenólicos estão presentes nestas matrizes amazônicas como já referenciado por Souza et al., (2008). Na Tabela 1 observa-se que todos os extratos e/ou frações apresentaram-se positivos confirmando assim a presença dessas substancias. A intensidade na coloração para o teste qualitativo foi evidenciado por símbolos variando de positivo a fortemente

positivo, essa variação pode ser relacionada com a concentração de compostos fenólicos em cada extrato e/ou fração, pois segundo Bora et al., (2005) a intensidade da coloração azul para o reativo Folin-Ciocalteu é maior quanto maior a quantidade de compostos fenólicos na solução.

Avaliação do teor de compostos bioativos

Polifenóis totais, esteroides totais, terpenoides totais

A Tabela 2 mostra os valores obtidos para a determinação colorimétrica dos compostos fenólicos, esteroides e terpenoides totais dos extratos brutos e frações das matrizes vegetais amazônicas. Os resultados estão expressos em miligramas de equivalentes de quercetina, β -sitosterol, linalol por grama de extrato seco respectivamente.

Tabela 2 – Concentração de polifenóis, esteroides e terpenoides totais dos extratos bruto e frações de folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*.

<i>B. crassifolia</i> Extrato bruto/ frações	<i>Polifenóis totais</i> (mg EQ / g ES)	<i>Esteroides totais</i> (mg E β -sitosterol /g ES)	<i>Terpenoides totais</i> (mg EL / g ES)
EB	124,39 \pm 4,11	5,65 \pm 1,82	11,17 \pm 2,30
FAE	43,54 \pm 2,21	19,67 \pm 2,11	ND
FM	341,47 \pm 5,10	ND	31,92 \pm 6,24
FHM	210,80 \pm 1,56	ND	ND
<i>I. edulis</i> Extrato bruto/ frações	<i>Polifenóis totais</i> (mg EQ / g ES)	<i>Esteroides totais</i> (mg E β -sitosterol /g ES)	<i>Terpenoides totais</i> (mg EL / g ES)
EB	59,49 \pm 2,55	3,47 \pm 0,46	14,08 \pm 2,46
FAE	35,26 \pm 2,12	ND	ND
FM	183,65 \pm 7,20	10,60 \pm 2,46	43,48 \pm 7,96
FHM	163,92 \pm 2,88	ND	ND

EB = Extrato Bruto; FAE = Fração Acetato de Etila; FM = Fração Metanol; FHM = Fração Hidrometanólica (1:1).

Observa-se na Tabela 2 que as folhas de *Byrsonima crassifolia* apresentam maior teor de polifenóis totais em relação ao *Inga edulis*, sugerindo que estas folhas sintetizam mais esses compostos. A menor concentração de polifenóis totais para o *Inga edulis* em relação a *Byrsonima crassifolia*, também pode ser observada nos estudos de Pompeu et al. (2012) e Silva (2007b).

É possível observar que na fração acetato de etila em ambas as espécies vegetais concentra-se a menor quantidade de compostos fenólicos totais. Isto é coerente com o fato de que o conteúdo de fenólicos totais é significativamente dependente dos solventes empregados. Quando se utiliza solvente um pouco polar, como acetato de etila, ele permite recuperar as agliconas livres pouco polares, tais como flavonas, flavonóides, flavanonas, di-hidroflavonóis,

isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação. Aumentando a polaridade do solvente, chegando até metanol : água, é possível extrair as agliconas poli-hidroxiladas, as flavonas em flavonóis mais polares, auronas, chalconas. O solvente influencia expressivamente os teores de polifenóis totais nos extratos. Em geral, os resultados demonstraram que os extratos alcoólicos apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, o etanol e metanol são os mais citados como melhores extratores de polifenóis em relação a solventes menos polares e a água pura (OH et al., 2013).

Nos estudos realizados por Sathishkumar et al., (2014), foram determinados o conteúdo total de fitoesteróis de folhas de *Tabernaemontana heyneana* Wall apresentando valor de aproximadamente 58,5 mg/g, valor este superior ao encontrado no estudo para as diferentes frações das folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* (19,67 e 10,60 mg E β-sitosterol / g ES).

Nos estudos realizados por Geetha, et al., (2015) para folhas *Tanacetum Parthenium* L. e Sumitha, et al., (2015) para as folhas de *Cleome chelidonii* Linn utilizando como padrão o linalol, foram determinados o conteúdo de terpenoides totais das frações metanólicas apresentando valores de 53,65 e 52,10 mg EL / g, próximos aos encontrados no estudo para as diferentes espécies amazônicas (31,92 e 43,48 mg EL / g).

Avaliação da capacidade antioxidante

ORAC e DPPH

Na Tabela 3 e 4 são apresentados os valores de capacidade antioxidante ORAC e DPPH encontrados nos extratos, frações das folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* e padrões.

Tabela 3 – Valores de capacidade antioxidante ORAC e DPPH encontrados nos extratos e frações das folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*.

<i>Extrato bruto/ frações</i>	<i>ORAC (μmol ET g-1 de ES)</i>		<i>DPPH (μM ET.g-1 ES)</i>	
	<i>B. crassifolia</i>	<i>I. edulis</i>	<i>B. crassifolia</i>	<i>I. edulis</i>
EB	4652 ± 708	942 ± 227	4491 ± 290	700 ± 45
FAE	3991 ± 505	357 ± 70	3258 ± 212	320 ± 70
FM	5869 ± 563	2223 ± 583	5175 ± 544	2073 ± 189
FHM	4191 ± 258	520 ± 46	3921 ± 623	470 ± 74

EB = Extrato Bruto; FAE = Fração Acetato de Etila; FM = Fração Metanol; FHM = Fração Hidrometanólica (1:1);

A capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações determinada pelo método ORAC, observado na Tabela 3, variou entre 3991 a 5869 $\mu\text{M EqT.g}^{-1}$ ES para *Byrsonima crassifolia* e de 357 a 2223 $\mu\text{M EqT.g}^{-1}$ ES para o *Inga edulis*. As frações metanólicas das diferentes espécies apresentam alto valor de ORAC. Tal fato pode ser justificado pela maior quantidade de compostos fenólicos encontrados nesta fração. Nos estudos realizados por Souza et al. (2008) empregando uma solução hidrometanólica (80:20 v/v) determinou a capacidade antioxidante das folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* (736 e 1.463 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de folha seca, respectivamente). Essa diferença em relação a capacidade antioxidante encontrada no estudo (Tabela 3) com os autor acima mencionados está possivelmente relacionada com o método de extração, purificação e a forma de expressar os resultados pelos autores.

O teste utilizando o radical livre DPPH verifica-se que as frações metanólicas das espécies vegetais apresentaram maior atividade antioxidante, isso pode ser justificado, pois para se obter uma boa atividade antioxidante de um extrato vegetal é necessário a máxima extração dos compostos biotivos, sendo que esses apresentam polaridades diferentes, e por isso a escolha do solvente é determinante (DUZZIONO et al., 2010). Assim a fração metanólica possivelmente extraiu inúmeras substancias que contribuíram para maior capacidade antioxidante e isso pode ser evidenciado quando comparamos os resultados, ao doseamento de polifenóis totais, esteroides totais e terpenoides totais para as fração metanólicas, infere-se que a capacidade antioxidante encontrada no ensaio está intimamente relacionada com a grande concentração de polifenóis, além da presença de esteroides vegetais e terpenoides na amostra.

Dentre os padrões (Tabela 4), o padrão β -sitosterol no método ORAC apresentou o maior valor de capacidade antioxidante (13,48 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$), enquanto que o padrão de compostos fenólicos a quercetina mostrou o maior valor no ensaio DPPH (22,08 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$). Isso pode ser justificado, pois o composto beta-sitosterol é capaz de sequestrar os radicais livres, quando a sua concentração for alta o suficiente na amostra (PANIAGUA-PÉREZ ET, AL., 2008).

Tabela 4 – Valores de capacidade antioxidante ORAC e DPPH encontrados nos padrões químicos.

<i>Padrões</i>	<i>ORAC ($\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$)</i>	<i>DPPH ($\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$)</i>
PQ	6,66 \pm 0,68	22,08 \pm 0,58
PBS	13,48 \pm 1,59	6,17 \pm 1,64
PL	9,46 \pm 2,19	2,95 \pm 0,16
ST	1,14 \pm 0,21	1,05 \pm 0,11

PQ = Padrão Quercetina; PBS = Padrão β -sitosterol; PL = Padrão Linalol; ST = Solução de Trolox.

Análise cromatográfica

A análise cromatográfica de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* estão representados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Constatou-se a presença de catequina, epicatequina, quercetina e ácido ferrúlico nos extratos bruto e frações, além de ácido gálico presentes nos extratos bruto das duas matrizes. Esses compostos, no entanto, apresentaram-se em baixas concentrações e não se encontraram dentro do limite da curva de calibração realizada para a quantificação dos mesmos. Apenas na fração metanol:água foram quantificados os conteúdos de catequina e epicatequina, fato que pode estar relacionado ao solvente mais polar utilizado nesta fração, que segundo a literatura consegue uma melhor extração de flavanóis, classe de compostos fenólicos em que se encontram a catequina e epicatequina (ALVARENGA, 2013). Os compostos majoritários observados na *Byrsonima* apresentaram tempo de retenção de 20,30 minutos (quercetin-3-O- α -D-arabinoside), 17,58 minutos (quercetin-3-O- β -D-galactoside), 18,70 minutos (quercetin-3-O- β -D-glucoside) e 23,00 minutos (quercetin-3-O- α -D-arabinoside-2"-gallate), e para *Inga edulis* tempos de 13,56 minutos (Miricetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside), 13,82 minutos (Quercetina-3-O-(-L-glucopyranoside) e 17,2 minutos (Quercetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside), com picos de absorção em espectros ultravioleta em 350 nm.

Tabela 5. Concentração dos compostos fenólicos do extrato bruto e frações de *Byrsonima crassifolia*

<i>Extratos e frações</i>	<i>Composto fenólico</i>	<i>Classe de fenólicos</i>	<i>Comprimento de onda de leitura (nm)</i>	<i>Tempo de retenção (min)</i>	<i>Quantificação dos compostos (mgEM gES⁻¹)</i>
Extrato bruto	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	3,20	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ácido ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavanol	350	27,47	n.q
	quercetin-3-O- α -D-arabinoside	Flavanol	350	20,30	20,00 \pm 0,35
	quercetin-3-O- β -D-galactoside	Flavanol	350	17,58	23,00 \pm 0,40
	quercetin-3-O- β -D-glucoside	Flavanol	350	18,70	23,00 \pm 0,45
	quercetin-3-O- α -D-arabinoside-2"-gallate	Flavanol	350	23,00	20,00 \pm 0,45
Fração metanólica	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ácido ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavanol	350	27,47	n.q
	quercetin-3-O- α -D-arabinoside	Flavanol	350	20,30	81,00 \pm 0,25
	quercetin-3-O- β -D-galactoside	Flavanol	350	17,58	70,00 \pm 0,35
	quercetin-3-O- β -D-glucoside	Flavanol	350	18,70	58,00 \pm 0,40
	quercetin-3-O- α -D-arabinoside-2"-gallate	Flavanol	350	23,00	38,00 \pm 0,40
Fração metanol: água	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,84	1,00 \pm 0,40
	Epicatequina	Flavanol	280	10,39	1,00 \pm 0,35
	Ácido ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,20	n.q
	Quercetina	Flavanol	350	27,41	n.q
	quercetin-3-O- α -D-arabinoside	Flavanol	350	20,30	36,90 \pm 0,50
	quercetin-3-O- β -D-galactoside	Flavanol	350	17,58	39,10 \pm 0,50
	quercetin-3-O- β -D-glucoside	Flavanol	350	18,70	25,00 \pm 0,45
	quercetin-3-O- α -D-arabinoside-2"-gallate	Flavanol	350	23,00	23,80 \pm 0,45

Os desvios padrões representam as variações nas concentrações da análise em triplicata. n.i=não identificado; n.q= não quantificado; nm= nanômetros; min=minutos; mgEM gES⁻¹=miligramas equivalentes miricetina por grama de extrato seco.

Souza et al. (2007) encontraram concentrações de 0,82; 9,67 e 25,43 mg EAG gES⁻¹ (miligrama equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco) para ácido gálico, catequina, epicatequina, respectivamente, em frações de extratos de *Inga edulis*. Dias et al. (2010) ao avaliarem o perfil de folhas de *Inga edulis* observaram concentrações de 1,98, 13,61, 6,32 e 1,76 mg g FS⁻¹ (miligrama por grama de fração seca) para ácido gálico,

catequina, epicatequina e quercetina, respectivamente. Foram ainda identificados por esses autores a presença de procianidina B1, procianidina B2, quercetina raminopiranosídeo, miricetina nos extratos de *Inga edulis*.

Tabela 6. Concentração dos compostos fenólicos do extrato bruto e frações de *Inga edulis*

<i>Extratos e frações</i>	<i>Composto fenólico</i>	<i>Classe de fenólicos</i>	<i>Comprimento de onda de leitura (nm)</i>	<i>Tempo de retenção (min)</i>	<i>Quantificação dos compostos (mgEQ gES⁻¹)</i>
Extrato bruto	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	3,20	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ác. ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavonol	350	27,47	2,00±0,45
	Miricetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside	Flavonol	350	13,56	7,00±0,30
	Quercetina-3-O-(-L-glucopyranoside	Flavonol	350	13,82	5,20±0,50
	Quercetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside	Flavonol	350	17,2	5,73±0,25
Fração metanólica	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ác.ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavonol	350	27,47	n.q
	Miricetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside	Flavonol	350	13,56	79,00±0,40
	Quercetina-3-O-(-L-glucopyranoside	Flavonol	350	13,82	49,00±0,50
	Quercetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside	Flavonol	350	17,2	6,40±0,40
Fração metanol:água	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,84	2,00±0,40
	Epicatequina	Flavanol	280	10,39	2,00±0,55
	Ác.ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	1,00±0,45
	Quercetina	Flavonol	350	27,39	n.q
	Miricetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside	Flavonol	350	13,56	10,00±0,65
	Quercetina-3-O-(-L-glucopyranoside	Flavonol	350	13,82	8,00±0,50
	Quercetina-3-O-(-L-rhamnopyranoside	Flavonol	350	17,2	110,00±0,70

Os desvios padrões representam as variações nas concentrações da análise em triplicata. n.i=não identificado; n.q= não quantificado; nm= nanômetros; min=minutos; mgEQ gES⁻¹=miligramas equivalentes quercetina por grama de extrato seco.

Gordon et al. (2011), observaram a presença de 19 tipos diferentes de compostos fenólicos em *Byrsonima crassifolia*, incluindo o ácido gálico, proantocianidinas e derivados de quercetina. Souza et al. (2008), observaram como composto majoritário em folha de *Inga edulis* a miricetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo com concentrações de 16,51 mg EAG gES⁻¹ (equivalente ácido gálico por grama de extrato seco). Assim como Dias et al. (2010), que observaram a miricetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo em concentrações de 18,52 e 26,82 mg g FS⁻¹ (miligramas por grama de fração seca).

A variação na identificação e quantificação de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, quantidade de metabólitos secundários presentes na planta, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes (ANGELO, 2007).

Os compostos majoritários presentes nas duas matrizes possivelmente estão inseridos na classe dos flavonóis, pelo tempo de retenção e espectro de absorção, fato que pode estar diretamente ligada a atividade antioxidante apresentada pelas matrizes, já que compostos dessa classe têm sido relacionados a inúmeras propriedades biológicas, inclusive atividade antioxidante (BORS et al., 1987; YUTING et al., 1990).

É necessário, mais pesquisas que possam identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nessas matrizes vegetais, além de outros compostos responsáveis pela capacidade antioxidante através do isolamento desses compostos por cromatografia preparativa para elucidação de sua eficiência de forma isolada e em sinergismo com a matriz vegetal.

CONCLUSÕES

A extração sequencial de polaridade crescente com três solventes diferentes possibilitando a obtenção de extratos brutos e frações para a realização dos testes fitoquímicos de caracterização, além de avaliar a capacidade antioxidante dos extratos e das frações obtidas, podendo assim sugerir a possível presença de:

Fitoesteróis e terpenoides na fração acetato de etila e metanólica respectivamente para a *Byrsonima crassifolia* e para o *Inga edulis* a fração metanólica foi a fração que se apresentou positiva para os testes.

A capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC e DPPH indicaram que tanto os extratos brutos quanto as frações apresentam essa propriedade, em maior ou menor nível, com destaque para as frações metanólicas das folhas estudadas. As frações metanólicas das diferentes espécies apresentam alto teor em polifenóis totais, além da presença de fitoesteróis e terpenoides contribuindo assim como alto valor de ORAC e DPPH, indicando que os compostos presentes nas frações metanólicas possuem boa capacidade antioxidante. Apesar de a fração acetado de etila ter apresentado o menor valor de capacidade antioxidante e ser a fração com resultado positivo para esteroides vegetais para a *Byrsonima crassifolia*, o estudo pode evidenciar a importância da concentração elevada desse composto para que a capacidade antioxidante fosse mais pronunciada.

Compostos fenólicos estão presentes nestas matrizes vegetais como constatado na literatura, mas o estudo contribui para informações referentes à concentração desses compostos em função do tipo de solvente empregado avaliando qualitativamente e quantitativamente.

Na análise cromatográfica foram identificados 4 compostos majoritários para *Byrsonima crassifolia* e 3 para *Inga edulis*, pertencentes possivelmente a classe dos flavonóis. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento de novos compostos bioativos responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos vegetais das espécies amazônicas *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*, logo como perspectiva um estudo mais detalhado desses compostos responsáveis pela capacidade antioxidante desponta interesse imediato para os mais diversos setores do conhecimento, uma vez que envolve aspectos da química, nutrição, entre outras, no sentido de encontrar respostas para promoção da saúde das pessoas; portanto, para a melhoria da qualidade de vida, além de deixar evidente o potencial dessas plantas e assim contribuir com o busca desenvolvimento tecnológico da região.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, J.C.; SERRANO, R.P.; OSPINA, L.F. TORRES, L.A.A. Biological activity of saponins from the bark of *Inga marginata* Willd. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v. 27, p. 17-19, 1998.

AYOOLA, G.A.; COKER, H.B.; ADESEGUN, S.A.; ADEPOJU-BELLO, A.A; OBAWEYA, K.; EZENNIA, E.C.; ATANGBAYILA, T.O. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, pp. 1019–1024, 2008.

ALVARENGA, F. Q; MOTA, B. C. F; LEITE, M. N; FONSECA, J. M. S; OLIVEIRA, R. V. A. In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal Ethnopharmacol.** v.150(1), p. 280-284, 2013.

ANGELO, P. M; JORGE, N. Phenolic Compounds in foods- A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(1): 1-9, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BORA K, MIGUEL O.G, ANDRADE CA, OLIVEIRA AOT. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dickson Iaceae. **Visão Acadêmica.** 6(2):6-15, 2005.

BORS, W., AND M. SARAN, Radical Scavenging by Flavonoid Antioxidants, **Free Radical Research Communications.** 2:4–6, 1987.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, 299, 50–62, 1999.

CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 134-142, 2006.

CELIK, S.; OZKAYA, A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 35, p. 547-552. 2002.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43 p. 1603-1606, 2010.

DECKER, E.A. Antioxidant Mechanisms. Em: AKOH, C. C.; MIN, D. B. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 3^a Ed. Boca Raton, FL – USA: CRC Press. p. 475-492, 2008.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, 15: 1-5, 2010.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Purification of phenolic compounds from *Inga edulis* leaves using solid-phase extraction: major compounds quantification and antioxidant capacity evaluation. **Química Nova**.v. 33, p. 38-42, 2010.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUZZIONO, A.G; FRANCO, A.G; DUZZIONI, M.; SYLOSLOS, C. M. Determinação da atividade antioxidante e de constituintes bioativos em frutas cítricas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n.4, p. 643-649, 2010.

GEETHA, N.; SUBHA, D.; CHANDRALEGA, N. Phytochemical Screening of *Tanacetum Parthenium* L. (Feverfew) Leaves: An Important Medicinal Plant. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, vol. 2 (2): 98-106, 2015.

GHORAI, N.; CHAKRABORTY, S.; GUCCHAIT, S.; SAHA, SK.; BISWAS, S. Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. **Nature protocol Exchange**, 2012.

HEMAMALINI, K.; ANARUG, B. Evaluation of phytochemical and pharmacological activity of methanolic extract of *Sophora interrupta*. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, 3(8), 6381-6390, 2013.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M. F.; JUDITH, A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4437–4444, 2002.

- JOSHI, A.; BHOBE, M.; SAATARKAR A. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, pp. 80–87, 2013.
- MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 548-560, 2008.
- NACZK, M.; SHAHID, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. v. 1054, p. 95-111, 2004.
- NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. **Industrial Crops and Products**, v.53, p.133-139, 2014.
- OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, London, v. 31, n. 2, p. 263-620, 2013.
- PANIAGUA-PÉREZ, R.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; REYES-CADENA, S.; ALVAREZ-GONZÁLEZ, I.; SÁNCHEZ-CHAPUL, L.; PÉREZ-GALLAGA, J.;
- POZO-INSFRAN, D., BRENES, C.H., TALCOTT, S.T (2004). Phytochemical composition and pigment stability of açai. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1539-1545, 2004.
- POMPEU, D.; SILVA, E.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, 100, 6076-6082, 2009.
- POMPEU, D. R.; ROGEZ, H.; MONTEIRO, K. M.; TINTI, S. V.; CARVALHO, J. E. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazônica**, 42 (1): 165-172, 2012.
- SABIR, S.M; HAYAT ,I.; GARDEZI, S.D.A. Estimation of sterols in edible fats and oils. **Pakistan Journal of Nutrition**, 2, 178–181, 2003.
- SATHISHKUMAR, T.; BASKAR, R. Screening and quantification of phytochemicals in the leaves and flower of *Tabernaemontana heyneana* Wall. – a near threatened medicinal plant. **Indian Journal of Natural Product and Resources**, vol. 5 (3), p. 237-243, 2014.
- SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R; LAMUELA – RAVENTOS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin- Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, 299: 152-178, 1999.
- SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian Region. **Journal Food chemistry**, 101, 1012-1018, 2007a.
- SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, 55: 381-387, 2007b.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, 18 (6): 1276-1280, 2007.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; RESS, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, 106: 331-339, 2008.

SUMITHA, V.; GURULAKSHMI, M. Antioxidant and free radical scavenging activity of leaf extracts of *Cleome chelidonii* Linn. **International Journal of Innovation in Pharma Biosciences and Research Technology**. v.2, Issue (3), pp: 228-236, 2015.

TANYILDIZI, S; SERVI, K; CIFTCI, U. Protective effects of d-limonene and linalool on female rats intoxicated with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, ed. 5, p. 221-225, 2009.

VIVACONS, M.; MORENO, J.J. Beta-sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biology and Medicine** 39, 91-97, 2005.

GORDON, A; JUNGFER, E; SILVA, B. A; MAIA, J. G. S; MARX, F. Phenolic Constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon Region. **Agricultural and Food Chemistry**.v.59, p. 7688-7699, 2011.

OU, B.; HAMPSCH, M. W.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 10, p.4619 – 26, 2001.

PELLEGRINI, N; COLOMBI, B; SALVATORE, S; BRENNNA, O. V; SALVATORE, S; BRENNNA, O. V; GALAVERNA, G; DEL RIO, D; BIANCHI, M; BENNET, R. N; BRIGHENTI. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetables foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 87, p. 103-111, 2007.

POMPEU, D; SILVA, E; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 6076-6082, 2009.

YUTING, C., Z. RONGLIANG, J. ZHONGJIA, AND J. YONG, Flavonoids as Superoxide Scavengers and Antioxidants, **Free Radical Biology and Medicine**. 9:19–21 (1990).