

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

KAMYLA MENEZES CAVALCANTE

**PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE CARÁ-
MOELA (*Dioscorea bulbifera*) E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2021

KAMYLA MENEZES CAVALCANTE

**PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE CARÁ-
MOELA (*Dioscorea bulbifera*) E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**PRE-PURIFICATION OF CHLOROFORM EXTRACT OF GIZZARD YAM
(*Dioscorea bulbifera*) AND EVALUATION OF POTENTIAL
ANTIOXIDANT ACTIVITY**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sirlei Dias Teixeira

PATO BRANCO - PR

2021



Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pato Branco
Departamento de Química
Curso de Bacharelado em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE CARÁ-MOELA
(*Dioscorea bulbifera*) E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

por

KAMYLA MENEZES CAVALCANTE

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 01 de dezembro de 2021 às 08 horas e 20 minutos como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Sirlei Dias Teixeira
Profa. Orientadora

Cleidiane da Silva
Membro titular

Edilson da Silva Ferreira
Membro titular

Nota: O Documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064.053623/2021-79.

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Josemar e Maria Francisca, por todo amor, carinho e apoio de sempre. Por sempre me incentivarem a ser alguém melhor, a não desistir e principalmente pelos seus ensinamentos, que me fizeram tornar quem sou.

Ao meu antigo professor de química do ensino médio Levi, por me apresentar o fantástico mundo da química, por ter sido o grande incentivador para que eu escolhesse a química como profissão.

À minha gata e companheira Clarice, sua presença tornaram meus dias mais alegres e leve nesses anos de graduação.

À minha professora e orientadora, Sirlei D. Teixeira, por todos os anos de trabalho em conjunto, pela oportunidade e confiança à mim concedidas, por todo o conhecimento, conselhos e experiências compartilhadas e por ser essa pessoa incrível.

Aos professores que tive a oportunidade de conhecer e que com certeza contribuíram em minha formação pessoal e profissional.

À meus amigos e colegas, em especial Marcus André, Bruna N, Filipe, Beatriz, Cleidiane, Vanessa, Bruno Henrique, Bruna G e Yasmin Milena por toda amizade e companheirismo, ajudas, tristezas e alegrias que compartilhamos durante esses anos.

À UTFPR e à todas as pessoas que contribuíram com a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“O mundo não se divide em pessoas boas e más. Todos nós temos luz e trevas dentro de nós. O que importa é o lado que escolhemos para agir. Isso é o que realmente somos.” – Sirius Black

RESUMO

CAVALCANTE, Kamyla Menezes. **Pré-purificação do extrato clorofórmico de cará-moela (*Dioscorea bulbifera*) e avaliação de potencial atividade antioxidante.** 2021. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (grau de bacharel em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2021.

A *Dioscorea bulbifera* é uma planta de origem africana conhecida como cará-moela, que apresenta frutos em forma de bulbo (tubérculo), utilizada na medicina popular para tratamento de doenças como bócio, câncer de estômago, dentre outras, além disso, integra o grupo das panc (plantas alimentícias não convencionais). Os vegetais, de maneira geral, apresentam composição química complexa e, para que se possa estudar os componentes responsáveis por potenciais atividades biológicas, faz-se necessário a separação e purificação de extratos brutos, por meio de métodos cromatográficos. A separação e purificação de compostos bioativos pode ser realizada por meio do fracionamento bioguiado, cujo objetivo é concentrar a bioatividade nos compostos purificados, dessa forma facilitando o estudo de substâncias bioativas. Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o fracionamento sólido-líquido bioguiado, a partir do extrato bruto de tubérculos de *D. bulbifera*, utilizando como ferramentas de avaliação de bioatividade, métodos de observação e análise de atividade antioxidante. O fracionamento sólido-líquido foi realizado a partir do extrato clorofórmico liofilizado, resultante da pré-purificação por meio de partição líquido-líquido do extrato bruto, utilizando gradiente de polaridade (clorofórmio, acetato de etila e metanol). Esse extrato, além de uma de suas frações, foram submetidos à avaliação quanto a capacidade antioxidante utilizando-se os métodos *in vitro* de FRAP, DPPH •, ABTS •+ e Fenólicos Totais. O fracionamento do EC resultou em 120 frações que foram agrupadas por similaridade resultando em 20 frações, onde uma das frações foi selecionada para avaliação de seu potencial antioxidante. Os resultados obtidos para atividade antioxidante do EC foram superiores ao da fração selecionada, com exceção do método de capacidade de redução do ferro (FRAP) onde a fração F14 apresentou resultados de $4114 \pm 19,2 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ enquanto para o EC os resultados obtidos foram de $2557 \pm 8,79 \mu\text{mol ET g}^{-1}$.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Fracionamento. Bioatividade. Produtos naturais.

ABSTRACTS

CAVALCANTE, Kamyla Menezes. **Pre-purification of chloroform extract of gizzard yam (*Dioscorea bulbifera*) and evaluation of potential antioxidant activity**. 2021. 44 f. Course Conclusion Paper (Bachelor's Degree in Chemistry) - Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2021.

Dioscorea bulbifera is a plant of African origin known as cara-moela, which bears bulb-shaped fruits (tubers), using popular medicine to treat diseases such as goiter, stomach cancer, among others. of panc (non-conventional food plants). Vegetables, in general, have a complex chemical composition and, in order to study the potential components by biological activities, it is necessary to separate and purify crude extracts through chromatographic methods. The separation and purification of bioactive compounds can be performed through bioguided fractionation, whose objective is to concentrate the bioactivity in the purified compounds, thus facilitating the study of bioactive substances. In this context, the objective of this work was to carry out the bioguided solid-liquid fractionation, from the crude extract of *D. bulbiferatubers*, using as tools for bioactivity evaluation, observation methods and antioxidant activity analysis. The solid-liquid fractionation was carried out from the lyophilized chloroform extract, resulting from the pre-purification through liquid-liquid partition of the crude extract, using a polarity gradient (chloroform, ethyl acetate and methanol). This extract, in addition to one of its fractions, were evaluated for antioxidant capacity using the in vitro methods of FRAP, DPPH •, ABTS • + and Total Phenolics. The EC fractionation resulted in 120 fractions that were grouped by similarity into 20 fractions, where one of the fractions was passed to evaluate its antioxidant potential. The results obtained for the EC antioxidant activity were superior to the required fraction, with the exception of the iron reduction capacity method (FRAP) where the F14 fraction presented results of $4114 \pm 19.2 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ while for the EC os results obtained were $2557 \pm 8.79 \mu\text{mol ET g}^{-1}$.

Keywords: Antioxidant activity. Fractionation. Bioactivity. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tubérculos de cará-moela	15
Figura 2 - Fórmula estrutural de flavonóides.	16
Figura 3 - Fórmula estrutural de a) fenol simples e b) ácidos fenólicos	18
Figura 4 - Fórmula estrutural básica de flavonoides	18
Figura 5 - Reação de oxirredução entre ácido gálico e molibdênio VI	20
Figura 6 - Estrutura do radical livre estável DPPH•	21
Figura 7 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante AOH através da transferência de um átomo de hidrogênio.....	21
Figura 8 - Estrutura molecular do ABTS [2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].....	22
Figura 9 - Reação entre radical cátion ABTS•+ e composto antioxidante AOH	22
Figura 10 - Reação de oxirredução envolvida no ensaio de FRAP.....	23
Figura 11 - Fracionamento cromatográfico em coluna flash de sílica gel	25
Figura 12 - A avaliação do perfil cromatográfico das frações obtidas foi monitorada por CCD analítica	26
Figura 13 - Ensaio da determinação do teor de compostos fenólicos totais.	27
Figura 14 - Ensaio atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.....	28
Figura 15 - Ensaio da atividade antioxidante pelo método de captura do radical cátion ABTS•+	29
Figura 16 - Ensaio da atividade antioxidante pelo método FRAP	30
Figura 17- Frações coletadas a partir da coluna flash.....	31

Figura 18 - Fração F14 após evaporação de solvente33

Figura 19 - Perfil cromatográfico da fração F1434

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimentos das frações. 32

Tabela 2 - Atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), teor de compostos fenólicos do extrato e fração de *D. bulbifera*35

LISTA DE SÍMBOLOS E NOMENCLATURA

ABTS - 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico);
AEAC - Capacidade Antioxidante Equivalente de Ácido Ascórbico;
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
CCD - Cromatografia em Camada Delgada;
CFT - Compostos Fenólicos Totais;
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil;
EAG - Equivalente de Ácido Gálico;
EC - Extrato Clorofórmico;
FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power;
PANCs - Plantas Alimentícias Não Convencionais;
TEAC - Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox;
TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVOS GERAIS	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	PRODUTOS NATURAIS	13
3.2	PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC's)	14
3.2.1	<i>Dioscorea bulbifera</i>	14
3.3	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	16
3.4	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO	19
3.5	ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	19
3.5.1	Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu	19
3.5.2	Capacidade antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)	20
3.5.3	Atividade antioxidante pelo método de captura do radical cátion ABTS•+	21
3.5.4	Atividade antioxidante pela capacidade de redução do ferro (FRAP)	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	FRACIONAMENTO	24
4.1.1	Fracionamento cromatográfico em coluna flash de sílica gel	24
4.1.2	Cromatografia em Camada Delgada	25
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E FRAÇÃO F14	26
4.2.1	Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)	26
4.2.2	Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•	27
4.2.3	Atividade antioxidante pelo método de captura do radical cátion ABTS•+	28
4.2.4	Atividade antioxidante pelo método FRAP	29
5	RESULTADOS	31
5.1	FRACIONAMENTO	31
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E FRAÇÃO F14	35
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais como fonte de medicação vem sendo feito há milhares de anos por meio do conhecimento popular, principalmente pela ingestão dos compostos presentes em plantas medicinais na forma de chás, infusões e outras formulações, com o intuito de tratar doenças.

Costa (2009) afirma que os produtos naturais foram os principais componentes das farmacopéias do século XIX. Afirma ainda, que o isolamento de substâncias em sua forma pura, provenientes de produtos naturais foi um passo decisivo ao final do século XIX para a criação da indústria farmacêutica.

Produtos naturais têm sido fonte de estudos para o desenvolvimento e produção de novas drogas, permitindo assim o avanço na descoberta de compostos com fins terapêuticos contra doenças e malefícios causados ao organismo humano. É evidente a importância desses compostos, assim como a sua caracterização.

O cará-moela (*Dioscorea bulbifera*) é uma planta trepadeira originária do continente africano e considerada uma planta alimentícia não-conveccional. Popularmente utilizada como planta medicinal para diversos tratamentos como o de conjuntivites (KUETE et. al. 2012), ou ainda doenças como câncer de estômago (GHOST, 2013). Estudos como o de Chaniad et. al. (2020) identificaram a presença de compostos flavonoídicos com capacidade antioxidante nos tubérculos de cará-moela.

Degàspari; Waszczynsky (2004) afirmam que o consumo de vegetais que apresentam em sua composição química, substâncias antioxidantes, pode fornecer uma ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem no organismo humano a partir da captura de radicais livres, impedindo ou retardando o surgimento de doenças que degradam células e o organismo.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo do fracionamento de extrato clorofórmico liofilizado, de tubérculos de cará-moela através de técnicas cromatográficas, além de avaliar a bioatividade do extrato e da fração selecionada, por meio de atividade antioxidante por meio de técnicas *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo de fracionamento bioguiado do extrato clorofórmico de tubérculos de Cará-Moela (*Dioscorea bulbifera*), utilizando análises de atividade antioxidante do extrato clorofórmico e de uma fração desse extrato.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Purificar o extrato clorofórmico de tubérculos de *D. bulbifera* por meio de métodos cromatográficos;
- Avaliar o comportamento de uma fração obtida, utilizando cromatografia em camada delgada;
- Avaliar a bioatividade do extrato clorofórmico e de fração selecionada, por meio de atividade antioxidante.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS

O uso popular de plantas alimentícias e medicinais de acordo com Pinto et. al. (2006) é uma alternativa viável, principalmente quando se fala em populações que habitam em florestas tropicais, pois a partir dessas florestas é possível a obtenção de alimentos e remédios naturais que ajudam no tratamento de diversas doenças, assim como a manutenção da saúde dessa população.

Algumas espécies de algas, fungos, bactérias e plantas possuem a capacidade de produzir metabólitos especializados (secundários), que são segundo Fumagali et. al. (2008) compostos conhecidos por desempenharem um importante papel na adaptação e desenvolvimento dessas espécies em seus ambientes e também por apresentarem uma fonte de substâncias farmacologicamente ativas, principalmente no caso das espécies vegetais.

O estudo dos metabólitos especializados tem crescido nos últimos 30 anos e através da via metabólica secundária de espécies vegetais e através de técnicas analíticas como a cromatografia, eletroforese, entre outros, é possível identificar os metabólitos e suas fórmulas estruturais, mediante a sua natureza química, (ALMEIDA, 2017).

Segundo Simões et. al. (2017), a atividade biológica de espécies vegetais em sua maioria, está diretamente ligada à presença e produção de metabólitos específicos ou moléculas de baixo peso molecular e que apresentam menores concentrações quando comparados aos compostos produzidos pela via metabólica primária, como glicídeos, por exemplo.

Por apresentarem propriedades biológicas, atualmente a utilização de plantas medicinais é uma prática segundo Mattos et. al. (2018), mundialmente disseminada e encorajada pela Organização Mundial de Saúde. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) relata que, de acordo com a Resolução nº 26 da Anvisa (2014), fitoterápicos são produtos que não incluem na sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas. Ao isolar uma substância ativa pura, obtêm-se então os fitofármacos (SILVA, 2018).

3.2 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (panc's)

Liberato, Lima, Silva (2019) afirmam que a mudança no padrão alimentar acontece quando se tem o conhecimento dos benefícios de uma dieta saudável e equilibrada, o que tem levado as pessoas a buscar uma vida saudável e novas formas de alimentação, onde proteínas, carboidratos, fibras, minerais, entre outros, sejam provenientes de alimentos como legumes, frutos, cereais, hortaliças. Essa procura por alimentos benéficos tem possibilitado a introdução de plantas alimentícias não convencionas (panc's) na alimentação humana.

Segundo Kelen et al., (2015), em 2008 o termo panc, foi criado pelo biólogo e professor Valdely Ferreira Kinupp e refere-se a todas as plantas que possuem partes comestíveis, sejam elas cultivadas ou que cresçam de forma espontânea, nativas ou exóticas, que não estejam inclusas em nosso cardápio diário.

Já de acordo com a definição descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o termo panc está relacionado com plantas que ainda não foram completamente estudadas por parte da comunidade técnico-científica, ou ainda, que apresentam consumo regional, mas que tem apresentado dificuldade de aceitação e consumo para as demais regiões do país (BRASIL, 2010).

As plantas alimentícias não convencionais são fonte de vitaminas essenciais, fibras, antioxidantes e sais minerais, ou seja, possuem diversos nutrientes necessários para o bom funcionamento do nosso organismo, dessa forma, podem fazer parte do consumo diário do ser humano (KELEN, et al. 2015).

Pedrosa et. al. (2012), afirmam que o consumo e manejo de panc's são geralmente realizados por agricultores familiares e povos tradicionais, onde além de serem utilizadas como parte da alimentação, algumas também são utilizadas na fitoterapia e medicina popular.

3.2.1 *Dioscorea bulbifera*

Popularmente conhecido como cará-moela ou cará-do-ar a *D. bulbifera* (Figura 1) é uma espécie vegetal pertencente ao gênero das *Dioscorea*, que de

acordo com Silva et. al. (2020) agrupa 650 espécies distribuídas pelo mundo, sendo que 136 estão catalogadas no Brasil.

Podendo atingir até 6 metros de altura a *D. bulbifera* é uma espécie de planta trepadeira originária do continente africano e assim como os outros tipos de cará, o cará-moela é considerado uma espécie de inhame e um dos quesitos que o diferencia do cará convencional (*Dioscorea ssp.*), é que a *D. bulbifera* é classificada como uma panc, (NOVAES, 2015).



Figura 1 – Tubérculos de cará-moela. Fonte: Stadniki (2019)

Também classificado como uma planta medicinal, o cará-moela é amplamente utilizado no tratamento de doenças como bócio, câncer de estômago, carcinoma de reto, entre outras (GHOSH, 2013). Ainda de acordo com Ghosh et. al. (2013), extratos do tubérculo de cará-moela apresentaram resultados promissores em relação a atividades antitumorais, antioxidantes, anorexiantes, analgésicas, antiinflamatórias e anti-hiperglicêmicas.

Estudos realizados por Silva et. al. (2020), quanto aos parâmetros físico-químicos do cará-moela, mostram que a espécie *D. bulbifera* é a melhor escolha para introdução em dietas que necessitam de baixo consumo de carboidratos, podendo substituir outros tubérculos, além disso, também apresentou teor de fibras elevado e menor valor calórico quando comparado à espécie convencional *D. ssp.*

Estudando extratos etanólicos de tubérculos de *D. Bulbifera*, a partir da partição do extrato e técnicas cromatográficas, Chaniad et. al. (2020) conseguiram identificar e isolar substâncias como a quercetina, (+) - catequina e miricetina,

flavonoides que apresentam características antioxidante, antiinflamatória, dentre outras.

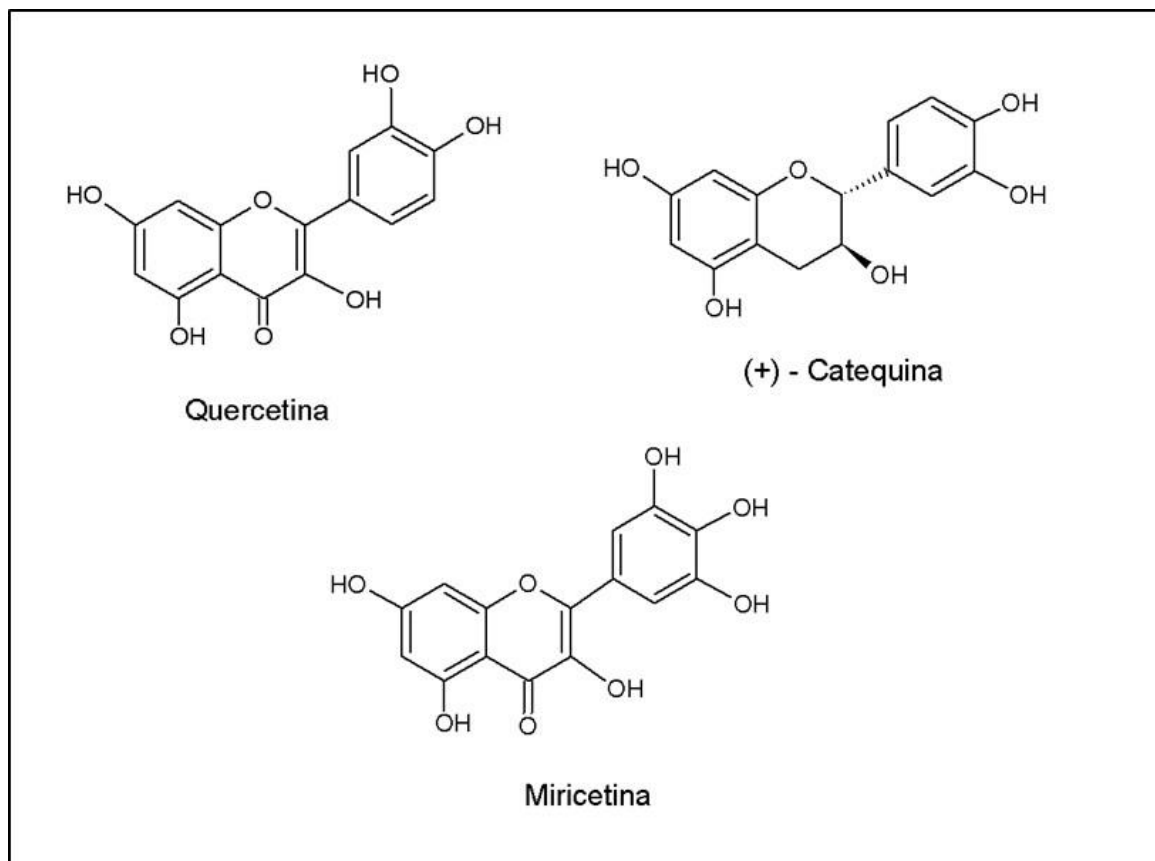


Figura 2 – Fórmula estrutural dos flavonoides quercetina, (+)- catequina e miricetina. Fonte: autoria própria (2021)

3.3 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

O processo respiratório e as reações oxidativas das células aeróbicas levam, segundo Silva et. al. (2010), à formação de radicais livres, que podem resultar no desenvolvimento de diversas doenças. Ainda de acordo com Silva et. al. (2010), as células do corpo humano dependem de seu potencial antioxidante para que assim possa ter proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais livres ou de espécies reativas do oxigênio.

Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons altamente instáveis e reativos que são liberados pelo metabolismo do corpo e podem causar doenças degenerativas de envelhecimento e morte celular, capazes ainda de desestabilizar

outras moléculas, desta forma gerando mais radicais livres. A ação dessas espécies pode ser inibida por agentes antioxidantes (MANDAL et. al. 2009).

Estudos têm mostrado que o consumo de vegetais que possuem compostos antioxidantes, pode fornecer uma ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem no organismo, uma vez que a ingestão de espécies vegetais está relacionada com a redução no risco de diversas de doenças crônicas como aterosclerose, câncer, doenças do coração, dentre outras (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

A ação antioxidante presente em plantas está associada, segundo Mandal et. al. (2009) com os metabólitos especializados. De acordo com os autores, as plantas desenvolveram estratégias de defesa como, por exemplo, o sistema antioxidante capaz de lidar com o estresse oxidativo através da produção de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais amplamente distribuídos na natureza e de acordo com Silva et. al. (2010), já foram detectados em plantas, diversos compostos fenólicos, que podem ser encontrados em uma variedade de frutos e vegetais. Soares (2002), relata que essa classe apresenta uma grande diversidade de compostos e ainda que, os compostos fenólicos que estão distribuídos no reino vegetal estão divididos em dois grandes grupos: flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos), como os exemplo apresentados nas Figuras 3 e 4.

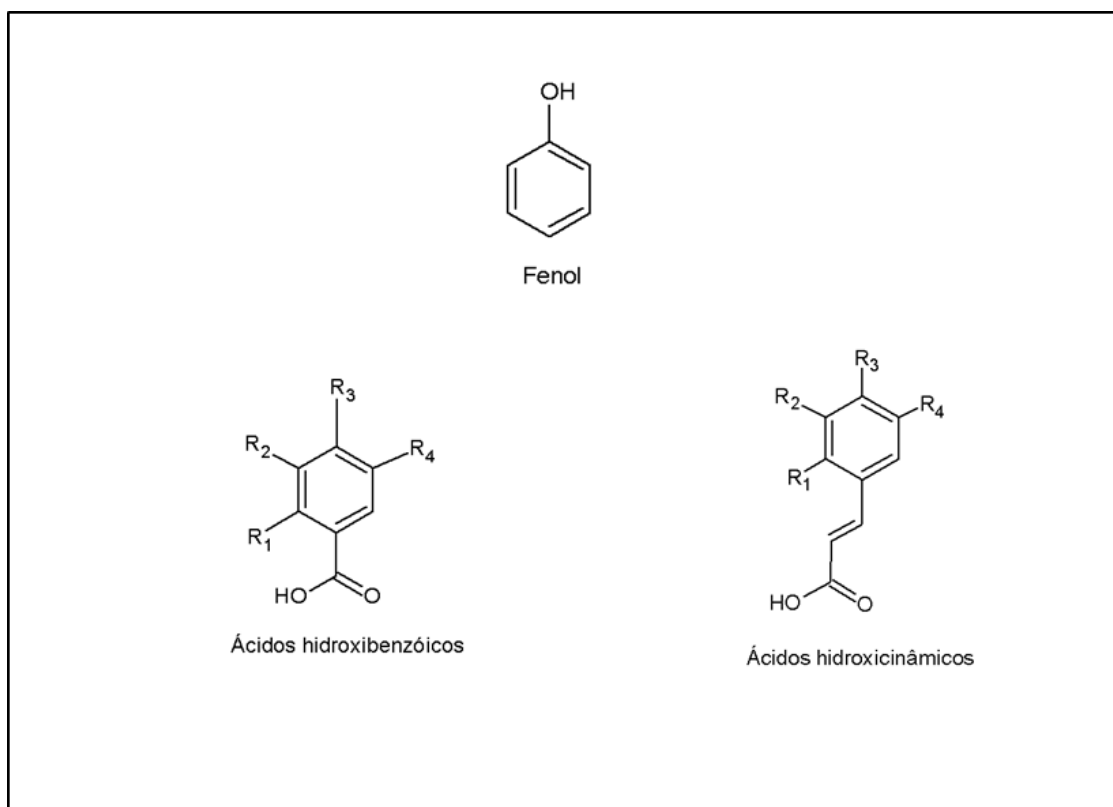


Figura 3 – Fórmula estrutural de a) fenol simples e b) ácidos fenólicos. Fonte: autoria própria (2021)

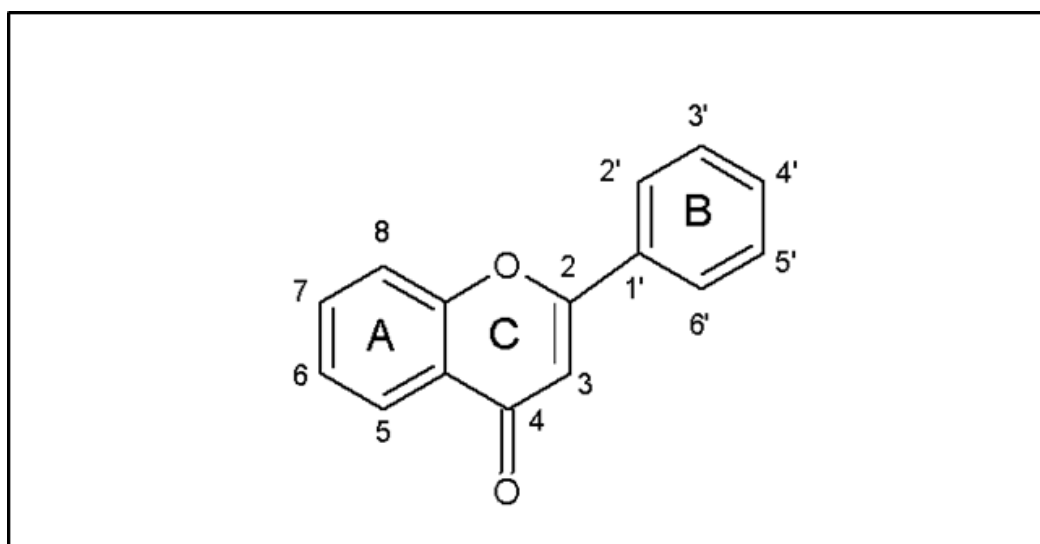


Figura 4 – Fórmula estrutural básica de flavonoides. Fonte: autoria própria, adaptado de Silva (2021)

3.4 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

O fracionamento de extratos vegetais é um método bastante utilizado no estudo da química de produtos naturais e tem como objetivo separar, identificar e purificar componentes como, por exemplo, os metabólitos especializados. De acordo com Simões et. al. (2017), o método também objetiva a obtenção de frações enriquecidas em compostos bioativos.

Simões et. al. (2017), afirmam que quando objetiva-se o isolamento de substâncias provenientes de extratos vegetais após a obtenção do extrato bruto, análises *in vitro* podem ser empregadas ou ainda técnicas cromatográficas, tal como, cromatografia em coluna, a fim de constatar a presença de grupos de metabólitos especializados ou compostos de interesse.

De acordo com Zocolo et. al. (2019), uma forma de avaliar o comportamento dos compostos bioativos é associar ao fracionamento cromatográfico, ensaios de cromatografia em camada delgada (CCD) a fim de monitorar o perfil cromatográfico das frações obtidas e assim agrupar as frações por similaridade, caso haja necessidade.

3.5 ESTUDO BIOQUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Um dos métodos mais antigos de quantificação de compostos fenólicos, o ensaio de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação entre compostos fenólicos e uma mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio (Figura 5), sendo esse o reagente Folin-Ciocalteu, onde a espécie Mo^{6+} apresenta coloração amarelada (SILVA, 2018).

Agentes redutores como por exemplo, os ácidos fenólicos presentes na amostra são oxidados em meio básico, causando a formação de ânions fenolatos que reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, resultando na redução do Mo^{6+} para Mo^{5+} , alterando a coloração do meio reacional para azulada, em que a mesma apresenta intensa absorção perto de 740-750nm, desta forma possibilitando a quantificação do teor de compostos fenólicos. Os resultados dessa análise são expressos em Equivalente de Ácido Gálico (EAG) (TOMEI; SALVADOR, 2007).

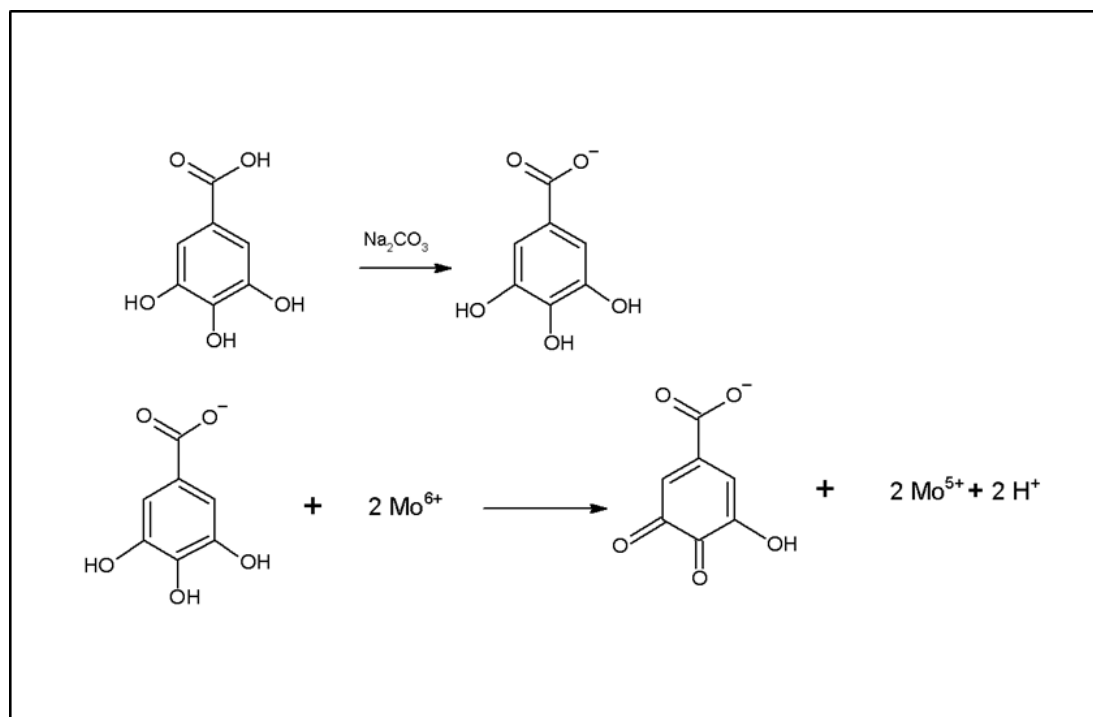


Figura 5 – Reação de oxirredução entre ácido gálico e molibdênio VI. Fonte: autoria própria (2021)

3.5.2 Capacidade antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) (Figura 6) é um radical orgânico livre e que apresenta estabilidade na ausência da luz, possui um elétron desemparelhado e tem coloração púrpura, com uma banda de absorção máxima característica em 517 nm (OLIVEIRA, 2015).

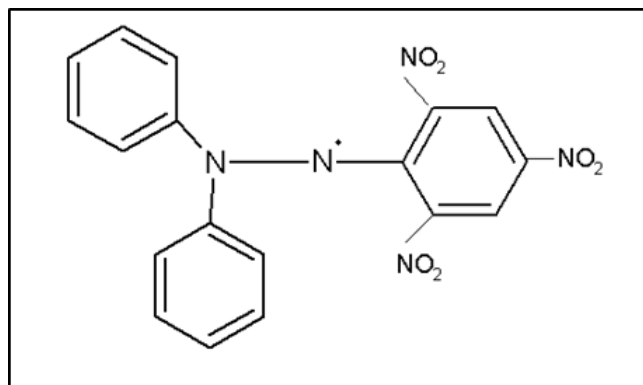


Figura 6 - Estrutura do radical livre estável DPPH•. Fonte: autoria própria (2021).

O método de DPPH• baseia-se, segundo Rufino et. al. (2007) na captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil por compostos doadores de hidrogênio, como os compostos antioxidantes, onde o radical é reduzido à DPPH-H (Figura 7).

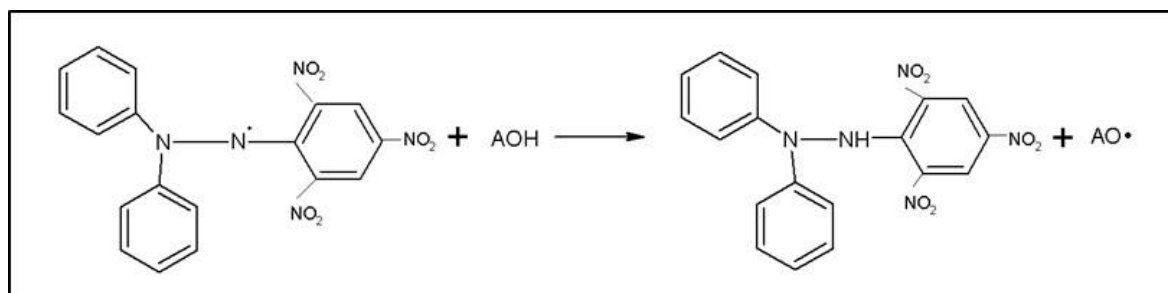


Figura 7 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante AOH através da transferência de um átomo de hidrogênio. Fonte: autoria própria (2021)

Quando o radical DPPH• é reduzido à DPPH-H sua coloração passa de púrpura para amarelo pálido, o que dificulta a absorção característica que o radical apresenta em 517 nm, assim diminuindo a leitura da absorção (SILVA, 2018).

3.5.3 Atividade antioxidante pelo método de captura do radical cátion ABTS•+

De coloração verde claro, o ABTS [2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)] é uma substância utilizada em ensaios colorimétricos para estimar o potencial antioxidante de substâncias e extratos vegetais. Ao reagir o ABTS com

oxidantes como, por exemplo, o persulfato de potássio ocorre a formação do radical catiônico ABTS•+ de coloração azul esverdeada (TORRES, 2017).

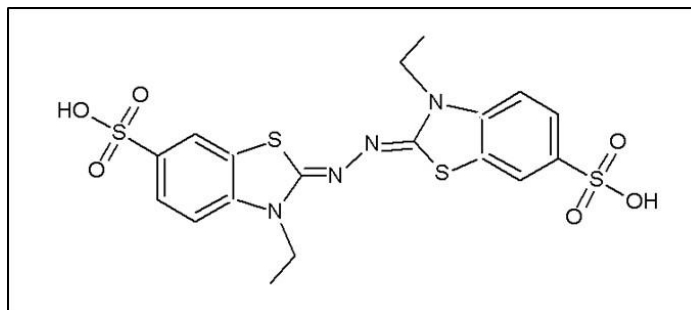


Figura 8 – Estrutura molecular do ABTS [2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. Fonte: autoria própria (2021)

O método consiste, segundo Oliveira (2015) na redução do radical cátion ABTS•+, através da reação com uma amostra que contenha antioxidantes (Figura 9), assim, a capacidade antioxidante é avaliada pela porcentagem de inibição da formação do radical cátion, que pode ser monitorada espectrofotometricamente com absorção máxima em 734 nm, utilizando o reagente trolox como padrão antirradical, assim os resultados obtidos são expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).

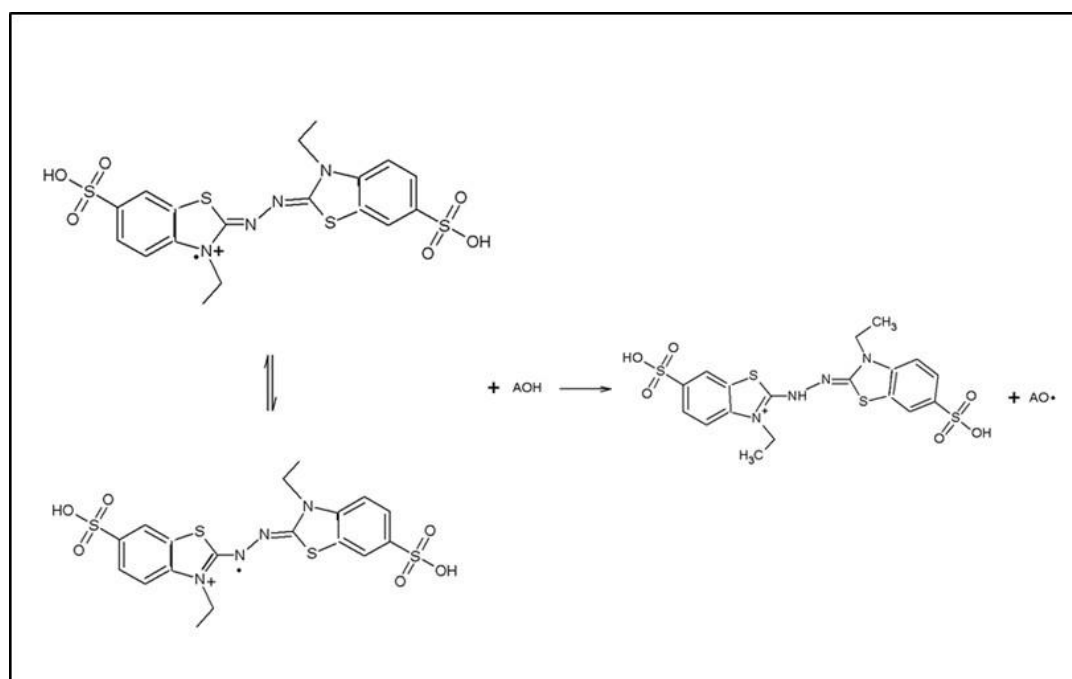


Figura 9 – Reação entre radical cátion ABTS•+ e composto antioxidante AOH. Fonte: autoria própria (2021)

3.5.4 Atividade antioxidante pela capacidade de redução do ferro

O princípio do método da atividade antioxidante pela capacidade de redução do ferro (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP*) está baseado na redução do íon Fe^{3+} , sua forma férrica, presente no complexo com 2,4,6-tripiridil-s- triazina (TPTZ) a Fe^{2+} , sua forma ferrosa, pela reação em meio ácido, com compostos antioxidantes, (Figura 10) (SARI, 2016).

Ao ocorrer a reação de redução do ferro, o meio reacional sofre uma alteração na coloração passando de azul claro para azul intenso, podendo ser lida a absorbância em comprimento de onda de 595 nm, e ainda segundo Victoria et. al. (2016), quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante da amostra analisada.

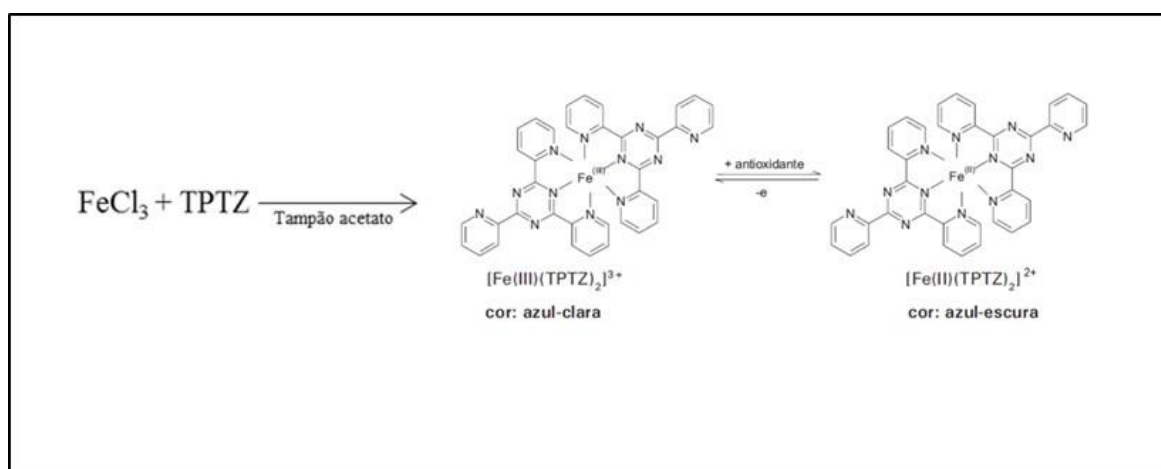


Figura 10 - Reação de oxirredução envolvida no ensaio de FRAP. Fonte: adaptado de Rafael Sari (2016)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FRACIONAMENTO

4.1.1 Fracionamento cromatográfico em coluna flash de sílica gel

A coluna flash foi preparada por meio do empacotamento em pasta, utilizando-se como fase estacionária 20 g de sílica gel (Sigma-Aldrich, 230-400mesh, tamanho de poro 60 Å) solubilizada em clorofórmio, essa mistura foi adicionada a uma coluna cromatográfica de vidro com placa porosa com torneira aberta permitindo a saída do solvente que foi coletado e passado novamente pela coluna com sílica até que o empacotamento fosse atingido, finalizando o empacotamento com o solvente no nível da fase estacionária. A coluna utilizada apresentava 2,0 cm de diâmetro, onde aplicou-se pressão suficiente para que a velocidade de eluição fosse de 5 cm min⁻¹.

Para o fracionamento foi utilizado 600 mg do extrato clorofórmico do bulbo de *D. bulbifera*, ressuspenso em clorofórmio, e posteriormente adicionado à coluna previamente empacotada.

A fase móvel utilizada na eluição (clorofórmio, acetato de etila e metanol), foi pré determinada, de forma analítica, utilizando cromatografia em camada delgada (CCD). Na eluição utilizou-se um gradiente com ordem crescente de polaridade, começando com clorofórmio:acetato de etila (80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100), seguido de acetato de etila:metanol (80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100).

As frações foram coletadas em tubos de ensaio com volume fixo de 5 mL, após eluição foram obtidas 120 frações.



Figura 11 – Fracionamento cromatográfico em coluna flash de sílica gel. Fonte: autoria própria (2021)

4.1.2 Cromatografia em Camada Delgada

A avaliação do perfil cromatográfico das frações obtidas foi monitorado por CCD analítica. Foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel 60 F254 (Macherey- Nagel), com 1,0 cm de espaçamento entre as amostras e 1 cm nas extremidades verticais.

Para a eluição utilizou-se como fase móvel, clorofórmio:acetato de etila:metanol em ordem crescente de polaridade. As cromatoplasas foram reveladas com solução de revelador anisaldeído sulfúrico e após reveladas, as frações foram agrupadas por similaridade.

Após obtenção das frações e suas respectivas massas, a fração F14 foi selecionada para avaliação de atividade antioxidante.



Figura 12 - A avaliação do perfil cromatográfico das frações obtidas foi monitorada por CCD analítica. Fonte: autoria própria (2021)

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E FRAÇÃO F14

4.2.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada através de método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia descrita por SINGLETON; ORTHOFER; RAVENTÓS (1999).

Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico, assim a curva de calibração foi obtida a partir de solução de ácido gálico com concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ppm e os resultados expressos em Equivalente de Ácido Gálico (EAG).

Adicionou-se 500 μL de amostra previamente diluída em tubo de ensaio com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e após 5 minutos de reação, adicionou-se 2,0 mL de de solução de carbonato de sódio (40 g L^{-1}). Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados e deixados em repouso sob o abrigo de luz por duas horas.

A leitura da absorbância foi medida em comprimento de onda de 740 nm em espectrofotômetro BEL SPECTRO S-2000 e realizadas em triplicata. Para o branco, as amostras foram substituídas por água destilada. Para essa análise foram testadas concentrações de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o EC e F14.

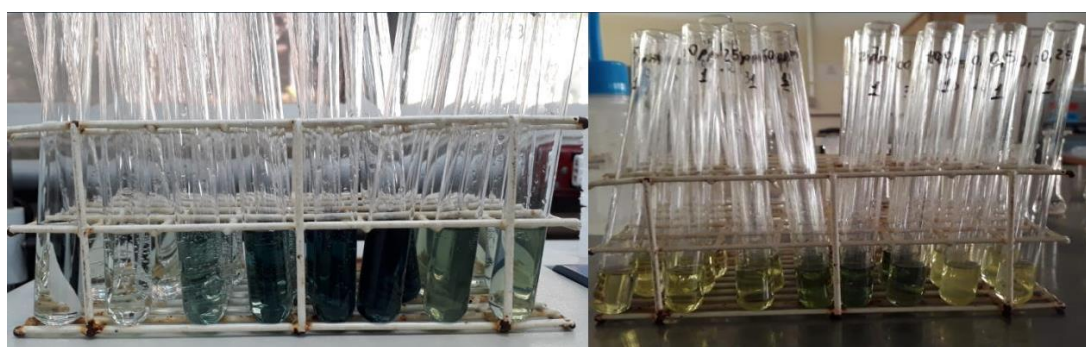


Figura 13 – Ensaio da determinação do teor de compostos fenólicos totais. Fonte: autoria própria (2021)

4.2.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•

A atividade sequestrante de DPPH• foi determinada pelo método de sequestro do radical DPPH• descrito por BRANDWILLIAMS, CUVÉLIER, BERSET (1995).

Uma solução de DPPH com concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada previamente em etanol. Utilizou-se como padrão de referência o Trolox, dessa forma a curva de calibração foi obtida a partir de solução de Trolox com concentrações de 15, 25, 50, 75 e $100 \mu\text{M}$ e os resultados foram expressos em μmol equivalente de trolox por g de amostra ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$).

Adicionou-se 500 μL de amostra preparada previamente em tubo de ensaio com adição de 3 mL de etanol 80% e 300 μL da solução DPPH. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 1 hora. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro BEL SPECTRO S-2000 com comprimento de onda em 517 nm. Como branco utilizou-se etanol 80%. Para essa análise foram

testadas concentrações de $0,0625 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o EC e F14.



Figura 14 – Ensaio atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•
Fonte: autoria própria (2021)

4.2.3 Atividade antioxidante pelo método de captura do radical cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$

A atividade antioxidante pelo método de captura do radical cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi determinada de acordo com as metodologias descritas por Rufino et al. (2007) e Wootton-Beard, Moran; Ryan (2011).

O radical cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi obtido previamente através da mistura de uma solução de ABTS (7 mmol L^{-1}) (Sigma-Aldrich) com persulfato de potássio (140 mmol L^{-1}), após seu preparo a solução permaneceu em repouso e ao abrigo da luz por 16 horas. No momento da análise, o radical cátion foi diluído em etanol P. A. até obter-se uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ A a 734 nm .

Em tubos de ensaio, adicionou-se $30 \mu\text{L}$ de amostra e 3 mL da solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ que foram agitados, incubados durante 6 minutos e em seguida, sua absorbância foi realizada a 734 nm , em triplicata. Para a curva padrão, utilizou-se uma solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-ácido carboxílico) em concentrações de $50, 100, 500, 1000, 1500 \mu\text{M}$. Como branco para análise utilizou-se etanol P.A. Os resultados foram expressos mg equivalente de trolox por g de amostra (mg ET g^{-1}). Para essa análise foram testadas concentrações de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o EC e F14.



**Figura 15 – Ensaio da atividade antioxidante pelo método de captura do radical cátion ABTS^{•+}.
Fonte: autoria própria (2021)**

4.2.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP

A atividade antioxidante pelo método do poder antioxidante de Redução de Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP*) foi realizada conforme metodologia descrita por RUFINO et. al. (2006) e WOOTTON-BEARD, MORAN; RYAN, (2011).

O reagente FRAP foi preparado previamente adicionando-se 25 mL de tampão acetato (300 mmol L⁻¹, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mmol L⁻¹ TPTZ em 40 mmol L⁻¹ HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mmol L⁻¹) em solução aquosa. Adicionou-se 3 mL do reagente FRAP em tubos de ensaio juntamente com 0,1 mL de amostra, a mistura foi homogeneizada e mantida em banho maria a 37 °C por 30 min.

Posteriormente a leitura foi realizada em espectrofotômetro BEL SPECTRO S-2000 a 595 nm, e como branco utilizou-se o reagente FRAP. A curva padrão foi construída com sulfato de ferro II com concentrações de 200, 500, 1000, 1500, 2000 µM e os resultados expressos em µmol de sulfato ferroso por grama de amostra (µmol FeSO₄ g⁻¹). Para essa análise foram testadas concentrações de 0,25 mg.mL⁻¹ para o EC e F14.

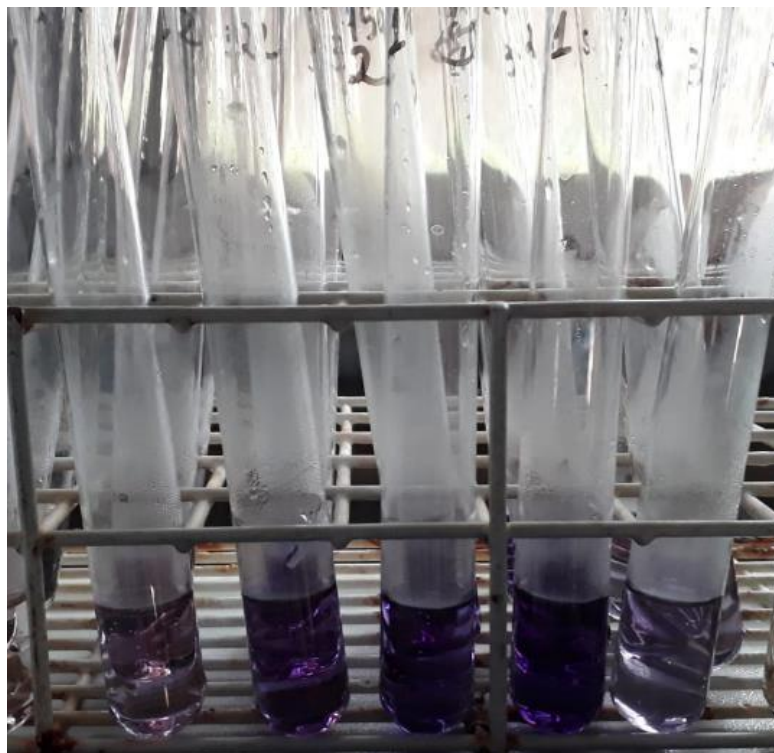


Figura 16 – Ensaio da atividade antioxidante pelo método FRAP. Fonte: autoria própria (2021)

5 RESULTADOS

5.1 FRACIONAMENTO

O fracionamento realizado em coluna de sílica flash utilizando 600 mg de extrato clorofórmico liofilizado de tubérculos de *D. bulbifera* resultou na obtenção de 120 frações. Na Figura 17 pode-se perceber uma alteração na coloração das frações obtidas, conforme o mudança no gradiente de solventes, o que pode indicar uma possível separação de compostos.



Figura 17- Frações coletadas a partir da coluna flash. Fonte: autoria própria (2021)

As 120 frações foram avaliadas quanto o seu perfil cromatográfico por CCD analítica e após o seu agrupamento foram obtidas 20 frações, denominadas F1 (83,6 mg), F2 (4,8 mg), F3 (49,3 mg), F4 (14,7 mg), F5 (21,4 mg), F6 (5,2 mg), F7 (38,8 mg), F8 (14,6 mg), F9 (6,5 mg), F10 (4,7 mg), F11 (3,6 mg), F12 (11,2 mg), F13 (10,1 mg), F14 (152 mg), F15 (6,7 mg), F16 (7,7 mg), F17 (45 mg), F18 (5,9 mg), F19 (65,7 mg) e F20 (3,8 mg).

A Tabela 1 apresenta os rendimentos das frações, partindo de 600 mg de extrato clorofórmico liofilizado.

Tabela 1 – Rendimentos das frações

Amostra	Rendimento (%)
F1	13,93
F2	0,80
F3	8,22
F4	2,45
F5	3,56
F6	0,86
F7	6,46
F8	2,43
F9	1,08
F10	0,78
F11	0,60
F12	1,86
F13	1,68
F14	25,33
F15	1,12
F16	1,28
F17	7,50
F18	0,98
F19	10,95
F20	0,63

Fonte: autoria própria (2021)

Observando a Tabela 1 nota-se que a fração que obteve o maior rendimento foi a F14 (Figura 18), m = 152 mg, obtida por meio do sistema de solventes acetato de etila:metanol (60:40).



Figura 18 – Fração F14 após evaporação de solvente. Fonte: autoria própria (2021)

Levando em consideração a fração que obteve maior rendimento e visando processo de purificação em estudos futuros, a fração F14 foi selecionada para avaliação de seu potencial antioxidante. Além disso, apresentou maior quantidade de substâncias com fator de retenção (R_f) diferentes, observados por cromatografia em camada delgada analítica. A Figura 19 apresenta o perfil cromatográfico da fração, onde utilizou-se como fase móvel o sistema de solventes clorofórmio: acetato de etila: metanol na proporção de 60:35:5 (v/v) respectivamente.

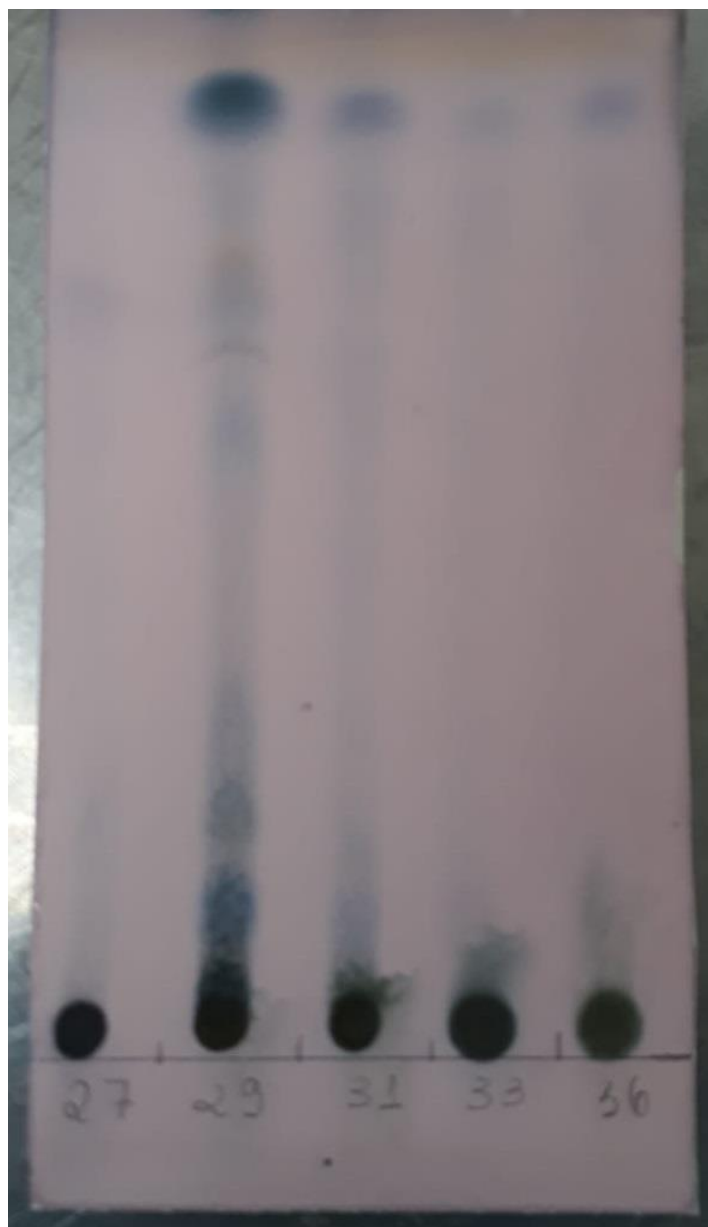


Figura 19 – Perfil cromatográfico da fração F14. Fonte: autoria própria (2021)

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E FRAÇÃO F14

Os resultados obtidos para a avaliação do potencial antioxidante do extrato clorofórmico e fração F14 de tubérculos de *D. bulbifera* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), teor de compostos fenólicos do extrato e fração de *D. bulbifera*.

Amostra	CFT (mg EAG g ⁻¹)	DPPH (μmol ET g ⁻¹)	ABTS (mg ET g ⁻¹)	FRAP (μmol Fe ²⁺ g ⁻¹)
Extrato Clorofórmico (EC)	97,64 ± 0,528	1721 ± 49,4	584,6 ± 3,04	2557 ± 8,79
Fração (F14)	37,60 ± 1,96	1189 ± 22,8	394,7 ± 5,09	4114 ± 19,2

Fonte: dados obtidos experimentalmente, autoria própria (2021). Notas: ET equivalente de trolox; EAG equivalente de ácido gálico.

SONG et al. (2010) obtiveram resultados de CFT para amostras de concentração de 50 mg mL⁻¹ de extratos metanólicos tubérculo *D. bulbifera* de 59,43 ± 1,03 mg EAG g⁻¹, enquanto os resultados obtidos neste estudo foram de 97,64 ± 0,528 mg EAG g⁻¹ para o extrato clorofórmico de tubérculo e de 37,60 ± 1,96 mg EAG g⁻¹ para a fração F14, ambos com concentração de 0,25 mg mL⁻¹.

Quando comparados os resultados obtidos para CFT é possível observar que obteve-se resultados mais significativos para o EC, uma vez que seu valor foi superior ao da fração F14, o que pode indicar que os compostos reativos ao método de CFT ficaram retidos na coluna de fracionamento no momento de obtenção da F14, assim podendo estar presente em outras frações obtidas pelo método ou ainda que os compostos presentes na fração F14 possivelmente não foram detectados pelo método CFT.

Ao observar os resultados obtidos pela análise antioxidante de DPPH nota-se que para o EC o resultado foi de 1721 ± 49,4 μmol ET g⁻¹, já para F14 obteve-se resultado de 1189 ± 22,8 μmol ET g⁻¹, Mainasara et. al. (2021) estudando extratos de folhas de *D. bulbifera* obtiveram percentuais de inibição do radical DDPH• de 79,0

$\pm 0,31\%$ para extrato metanólico, seguido pelo extrato de acetato de etila com $23,2 \pm 0,05\%$ e extrato de hexano com $11,5 \pm 0,31\%$, o que mostra que o extrato estudado por eles como o hexânico teve um potencial de inibição inferior aos obtidos a partir da análise com solvente mais polares. Stadniki (2019) avaliou atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical DPPH para extratos de *D. bulbifera* obtendo resultados entre 220,50 a 1861,33 mg ET g⁻¹.

Analisando resultados obtidos para o EC e a F14 referente a análise de DPPH, observa-se que o EC apresentou resultados mais promissores para este método, quando comparado aos valores obtidos para a F14, já que seu resultado foi de $1721 \pm 49,4$ $\mu\text{mol ET g}^{-1}$, o que pode indicar que compostos mais reativos frente ao radical DPPH podem estar presentes em outras frações obtidas.

Mainasara et. al. (2021), relatam em seus estudos, utilizando como padrão uma curva de ácido ascórbico, que o extrato hexânico de folhas de *D. bulbifera* obteve resultado de $9,50 \pm 0,48$ mg AEAC g⁻¹ para a análise de captura de ABTS•+. O presente estudo apontou resultados de $584,6 \pm 3,04$ mg ET g⁻¹ para o EC e $394,7 \pm 5,09$ mg ET g⁻¹ para F14, observa-se que para essa análise os valores obtidos de EC são superiores aos de F14, o que pode indicar que compostos capazes de capturar o radical cátion, assim como para a análise de CFT e DPPH, podem estar presentes em outras frações obtidas no fracionamento, ou ainda que os componentes da fração F14 não foram detectados pelo método de ABTS.

A análise de Mainasara et. al. (2021) mostra que para o método de FRAP o extrato de acetato de etila de folhas secas *D. bulbifera* foram de $59500 \pm 0,10$ $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$, superiores aos valores obtidos no presente estudo, que foram de $2557 \pm 8,79$ $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ para o EC e $4114 \pm 19,2$ $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ para a fração F14, enquanto no estudo realizado por Song et. al. (2010), os resultados obtidos com extrato metanólico de folha seca de *D. bulbifera* foram de $856,92 \pm 3,99$ $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$, inferiores aos obtidos para o EC e a fração F14. Nota-se que os resultados do EC para essa metodologia apresenta-se inferior aos resultados analisados para a F14, o que indica que os compostos capazes de reduzir o ferro podem estar presentes nesta fração.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi possível verificar que o fracionamento sólido-líquido do extrato clorofórmico liofilizado de *D. bulbifera* separou compostos através do gradiente de polaridade utilizado. Quanto ao potencial antioxidante tanto o extrato clorofórmico quanto a fração analisada apresentaram resultados positivos para os testes *in vitro* aplicados, contudo a fração estudada apresentou resultados inferiores quando comparados aos de extrato clorofórmico, com exceção para o método de FRAP. Através do perfil cromatográfico da fração, foi possível observar uma separação de substâncias com Rf diferentes, além de uma alta concentração de compostos na origem da placa cromatográfica, o que pode indicar que a fração deve ser submetida a um novo fracionamento e suas subfrações serem analisadas quanto ao seu potencial antioxidante. Os resultados mostram que a *D. bulbifera* é uma fonte natural de compostos antioxidantes e a importância da continuidade do fracionamento assim como aplicação de outras técnicas de separação a fim de purificar os compostos presentes em seus extratos aumentando sua bioatividade.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. F. L. S.; **Estudo das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, p. 61.2017.

ARAÚJO, M. E. M. B. **Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação in vitro de sua bioatividade**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco. Bragança Paulista, p.117. 2016.

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

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Hortaliças não-convencionais : (tradicionais)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. - Brasília : MAPA/ ACS, p .52, 2010.

CHANIAD, P. et. al. **Anti-inflammatory, wound healing and antioxidant potential of compounds from *Dioscorea bulbifera* L. bulbils**. Plos One, v. 15, n. 12, p.1-14. 2020.

COSTA, P. R. R. **Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária**. Virtual Química, v. 1, n. 1, p. 58-66, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos**. Visão Acadêmica, v. 5, n. 1, p. 33-40. 2004.

FUMAGALI, E.; *et. al.* **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma***. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 4, p.627-641, 2008.

GHOSH, S.; *et. al.* **Phytochemical analysis and free radical scavenging activity of medicinal plants *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*.** Plos One, v. 8, p. 1-17, 2013.

KELEN, M. E. B.; NOUHUYS, I. S. V.; KEHL, L. C.; BRACK, P.; SILVA, D.B. **Plantas alimentícias não convencionais (PANCs): hortaliças espontâneas e nativas.** (1ª ed.). UFRGS, Porto Alegre, 2015.

KUETE, V. *et. al.* **Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 12, n. 228, p. 1-8, 2012.

LIBERATO, P. S.; LIMA, D. V. T.; SILVA, B. **PANCs: plantas alimentícias não convencionais e seus benefícios nutricionais.** The journal Environmental Smoke, v. 2, n. 2, p. 102-111, 2019.

MAINASARA, M. M. *et. al.* **Secondary Metabolites, Antioxidant, and Antiproliferative Activities of *Dioscorea bulbifera* Leaf Collected from Endau Rompin, Johor, Malaysia.** Hindawi, p.10, 2021.

MANDAL, S.; YADAV, S.; YADAV, S.; NEMA, R. K. **Antioxidants: A Review.** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, v. 1, n. 1, p. 102-104, 2009.

MATTOS, G.; *et. al.* **Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária em saúde: percepção dos profissionais.** Revista Ciência e Saúde Coletiva, v. 23, n. 11, p. 3735-3744, 2018.

NOVAES, V. **Aprenda como cultivar o cará-moela.** 2015. Disponível em < <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2015/07/aprenda-como-cultivar-o-cara-moela.html> > . Acesso em jul. 2021.

OLIVEIRA, A. C.; *et. al.* **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** Revista Química Nova, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. **Biodisponibilidade de ácidos fenólicos.** Química Nova, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, G. L. S. **Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método de DPPH•: estudo de revisão.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

PEDROSA, M. W.; et. al. **Hortaliças não convencionais: saberes e sabores.** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PINTO, E. D. P. P.; AMOROZO, M. C. D. M.; FURLAN, A. **Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil.** Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 4, p. 751-762, 2006.

RUFINO, M. S. M.; et. al. **Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP).** Comunicado Técnico 125, Embrapa - Fortaleza, p. , 2006.

RUFINO, M. S. M.; et. al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+.** EMBRAPA, Fortaleza, p. 4, 2007b.

RUFINO, M. S. M.; et. al. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.** EMBRAPA, Fortaleza, p. 4, 2007a.

SARI, R. **Otimização da extração de compostos fenólicos e avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano das folhas de *Tabernaemontana catharinensis*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, p. 48, 2016.

SILVA, C. da. **Fracionamento bioguiado de folhas de *Syzygium malaccense*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, p. 43, 2018.

SILVA, M. L. C.; et. al. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais.** Semina: Ciências Agrárias. Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; RAVENTÓS, R. M. L. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent**. *Methods in Enzymology*. San Diego, v. 299, n. 15, p. 152-178, 1999.

SOARES, S. E.; **Ácidos fenólicos como antioxidantes**. *Revista de Nutrição*. Campinas, v. 15, n. 1, p 71-81, 2002.

SONG, F. L. et al. **Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 6, p. 2362-2372, 2010.

STADNIKII, J. **Caracterização química e da atividade biológica de metabólitos especializados presentes em extratos do tubérculo do carámoela (*Dioscorea bulbifera*). Aplicações potenciais em processos biotecnológicos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, p. 92, 2019.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. **Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais**. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, p. 1963-1967, 2007.

TORRES, P. B.; *et. al.* **Ensaio potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca**. Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, p. 1-4, 2017.

VICTORIA, V. U; *et. al.* **Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas**. Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, p. 1-6, 2016.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. **Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods**. *Food Research International*. Oxford, v. 44, p. 217-224, 2011.

ZOCOLO, G. J.; *et. al.* **Fracionamento de extratos vegetais em escala preparativa como ferramenta para formação de biblioteca de produtos naturais.** Embrapa, Fortaleza, p. 2-9, 2019.