

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**FABIO RICARDO RIZZI**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera***

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2016**

**FABIO RICARDO RIZZI**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *Moringa oleifera***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química, do departamento de Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador (a): Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

**PATO BRANCO**

**2016**

## TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Otimização do processo de extração de compostos bioativos a partir das folhas de moringa oleifera**, foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 5.2.1016-B de 2016.

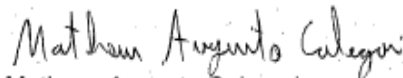
Fizeram parte da banca os professores.



Tatiane Luiza Cadorin Oldoni



Vanderlei Aparecido de Lima



Matheus Augusto Calegari

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, especialmente minha mãe Cecília Alves Rizzi, meu pai Neimar Vecente Rizzi e minha irmã Priscilla Rizzi, pelo apoio, suporte e compreensão nesta caminhada. Saibam que trago comigo todo o amor, respeito e gratidão do mundo a vocês. Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês dedicaram a mim, sempre com muito esforço. Sou muito orgulhoso da família que tenho.

Agradecer especialmente a minha namorada Jessica Michatowski, por toda a ajuda, compreensão, PACIÊNCIA e companheirismo que me deram forças para continuar lutando e por jamais me deixar desistir mesmo nos momentos mais difíceis. A sua presença e ajuda foram essenciais para que esse passo tenha sido executado.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni pelos ensinamentos repassados, pelo suporte para as pesquisas, e principalmente pela paciência e gentileza como trata seus orientados. Levo comigo uma grande admiração profissional.

Aos professores que fizeram parte dessa caminhada, levo comigo muitos ensinamentos profissionais e exemplos como pessoa.

Á todos os amigos que fizeram parte dessa caminhada acadêmica, seria impossível listar todos aqui. Trago um enorme carinho a todos pela amizade e companheirismo.

Á todos os funcionários da instituição UTFPR/PB, Central de Análises e LAQUA, por toda a ajuda, amizade e espaço cedido.

**GRATIDÃO.**

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”*

*Martin Luther King*

## RESUMO

RIZZI, Fabio Ricardo. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos a partir das folhas de *Moringa oleifera***. 79 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

A *Moringa oleifera* (Moringaceae) é uma planta originária da Índia que vem despertando interesse de pesquisadores e cientistas, devido sua capacidade biológica e suas comprovadas propriedades medicinais, já sendo usada no combate a hipertensão, tumores, artrite e como reforço alimentar. Tais propriedades medicinais são atribuídas à sua composição química que apresenta compostos fenólicos, compostos com atividade antioxidante e grandes quantidades de vitaminas e sais minerais. Levando em consideração essas propriedades, torna-se indispensável determinar um método de extração adequado que busque maximizar os teores de compostos presentes no extrato da planta, sendo um método que possua uma boa aplicabilidade e que seja eficaz, com viabilidade econômica e passível de ser estendido a maiores escalas. Para determinar o método de extração adequado, destaca-se a necessidade de bases científicas fornecidas por metodologias estatísticas, deste modo foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$ , com o intuito de avaliar as influências das variáveis independentes (temperatura, concentração do solvente etanol e tempo de extração) em relação as variáveis dependentes (respostas) que correspondem a atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), sequestro do cátion radical ABTS•<sup>+</sup> (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e o teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu. Para avaliar se as influências das variáveis independentes sobre as respostas foram significativas estatisticamente foi utilizado o software *STATISTICA*. Os resultados mostram que o experimento 9 que corresponde ao ponto central (0) das variáveis independentes foi o que apresentou melhores respostas para a avaliação da atividade antioxidante para o método de sequestro do radical ABTS•<sup>+</sup>, FRAP e teor de fenólicos totais. Para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH•, o experimento 4 que corresponde ao nível superior de solvente (+1), nível superior de temperatura (+1) e o nível inferior de tempo (-1) foi o que apresentou melhor resposta. Estatisticamente, para os métodos de avaliação da capacidade antioxidante ABTS e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), a variável temperatura e a interação entre temperatura e tempo tiveram influência significativa na resposta. Para a resposta DPPH, as variáveis concentração do solvente, temperatura, tempo e a interação entre concentração do solvente e tempo foram significativas. Para o método de determinação de fenólicos totais, as variáveis tempo, temperatura e as interações concentração do solvente/temperatura e temperatura/tempo tiveram influência significativa nas respostas. A curvatura foi significativa para todas as respostas, isso implica na evidência de que termos quadráticos devem ser determinados. A solução é aumentar o planejamento fatorial com quatro corridas axiais, resultando em um planejamento completo.

**Palavras-chave:** *Moringa oleifera*. Fenólicos Totais. Atividade Antioxidante. Planejamento Fatorial.

## ABSTRACT

RIZZI, Fabio Ricardo. **Optimization of bioactive compounds extraction process from the *Moringa oleifera* leaves.** 79 f. End of Course Assignment – Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2016.

The *Moringa oleifera* (Moringaceae) is a plant originally from India that has been attracting the interest of researchers and scientists, because of its biological capacity and its proven medicinal qualities, it has already been used to combat high blood pressure, tumors, arthritis and also as a food reinforcement. Such medicinal properties are attributed to its chemical composition, which presents phenolic compounds, compounds with antioxidant activity and large amounts of vitamins and minerals. Taking into account these properties, it is essential to determine a suitable extraction method that seeks to maximize the yields of compounds present in the plant extract, provided that it is a method that has a good applicability and to that it is effective, economically feasible and likely to be extended to larger scales. To determine the appropriate extraction method, there is the need for scientific basis provided by statistical methods, so a  $2^3$  factorial design was performed, in order to evaluate the influence of the independent variables (temperature, ethanol solvent concentration and time extraction) over the dependent variables (responses) that match the antioxidant activity by radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) sequestering methods, radical cation ABTS•<sup>+</sup> (2,2-azinobis-[benzotiazolin-3-ethyl-6-sulphonic-acid]) sequestering, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and phenolic content by Folin-Ciocalteu method. To assess whether the influence of independent variables on the responses were statistically significant, the STATISTICA software was used. The results have shown that the experiment 9, which corresponds to the center point (0) of the independent variables was the one who presented better responses for the evaluation of antioxidant activity for the radical ABTS•<sup>+</sup>, FRAP and total phenolic. For the evaluation of the antioxidant capacity by DPPH• method, the experiment 4 corresponding to top level solvent (+1), higher temperature level (+1) and the lower level of time (-1) has shown the best answer. Statistically, for the ABTS and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) antioxidant evaluation methods, the temperature variable and the interaction between temperature and time had a significant influence on the response. For the DPPH response, the variables solvent concentration, temperature, time and interaction between solvent concentration and time were significant. For the total phenolics determination method, the variables time, temperature and solvent/temperature and temperature/time interactions had a significant influence on the responses. Curvature was significant for all responses, this implies evidence that quadratic terms must be determined. The solution is to increase factorial planning with four axial races, resulting in complete planning.

**Keywords:** *Moringa oleifera*. Total Phenolics. Antioxidant Activity. Factorial Design.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	DELIMITAÇÃO DO TEMA	14
1.2	HIPÓTESES	15
1.3	OBJETIVOS	15
1.3.1	Objetivo Geral	15
1.3.2	Objetivos Específicos	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
2.1	IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE PLANTAS	17
2.1.1	Obtenção de Princípios Ativos a partir de Plantas	17
2.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E NITROGÊNIO (ERN)	18
2.2.1	Radicais Livres	19
2.2.2	Lipoperoxidação	19
2.3	AGENTES ANTIOXIDANTES	21
2.3.1	Compostos Fenólicos	22
2.3.1.1	Flavonoides	22
2.3.1.2	Não flavonoides	24
2.4	MATRIZ NATURAL DE ESTUDO – <i>MORINGA OLEIFERA</i>	24
2.5	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO	26
2.6	INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	27
2.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
2.7.1	Método de Avaliação do Conteúdo Total de Compostos Fenólicos – Folin-Ciocalteu	28
2.7.2	Método de Avaliação da Capacidade Antioxidante – Sequestro do Radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil)	29
2.7.3	Método de Avaliação da Capacidade Antioxidante – FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )	30
2.7.4	Método de Avaliação da Capacidade Antioxidante - Redução do Cátion Radical ABTS• <sup>+</sup> (2,2-azo-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)	31
<b>3</b>	<b>MATÉRIAS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1	MATERIAL VEGETAL	33
3.2	DESIGN EXPERIMENTAL – PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup>	33
3.3	EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	34
3.4	METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS – FOLIN-CIOCALTEAU	34
3.5	METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – SEQUESTRO DO RADICAL DPPH• (2,2-DIFENIL-1-PICRILIDRAZIL)	35
3.6	METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – FRAP	35
3.7	METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS• <sup>+</sup> (2,2-AZO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-SULFONATO)	36
<b>4</b>	<b>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	37
4.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.3	RESULTADOS PARA O MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH•	39



4.4	RESULTADOS PARA O MÉTODO DE REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS• <sup>+</sup> .....	48
4.5	RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS – FOLIN-CIOCALTEAU .....	56
4.6	RESULTADOS PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – FRAP .....	65
4.7	FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE .....	73
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Peroxidação Lipídica.....	20
Esquema 2 - Interrupção da cadeia radicalar na peroxidação lipídica por um antioxidante (AOH).....	21
Esquema 3 - Reação do ácido gálico reduzindo o Molibdênio (Mo) em meio alcalino. .....	29
Esquema 4 - Reação entre o radical estável (DPPH•) e um agente antioxidante .....	30
Esquema 5 - Redução do Fe <sup>3+</sup> para Fe <sup>2+</sup> na presença de um agente antioxidante (AOH) .....	31
Esquema 6 - Formação do radical ABTS• <sup>+</sup> na presença de persulfato de potássio e redução por um agente antirradicalar.....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Básica dos Flavonoides.....	23
Figura 2 - Não Flavonoides - Estrutura e Nome.....	24
Figura 3 - Comparação de nutrientes encontrados na <i>M. oleifera</i> com outras fontes conhecidas .....	25
Figura 4 - Folhas e pó das folhas da <i>Moringa oleifera</i> .....	26
Figura 5 - Extratos obtidos para a <i>Moringa oleifera</i> .....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis independentes e seus níveis - Planejamento Fatorial .....	33
Tabela 2 - Planejamento fatorial e dados experimentais sobre as variáveis dependentes para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•, redução do cátion radical ABTS• <sup>+</sup> , FRAP e teor de fenólicos totais .....	38
Tabela 3 - Resultados para o método de avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• .....	40
Tabela 4 - Estimativa dos efeitos para o método de sequestro do radical DPPH• ....	42
Tabela 5 - Coeficientes de regressão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• .....	47
Tabela 6 - Tabela ANOVA para o método de sequestro do radical DPPH• .....	47
Tabela 7 - Resultados para o método de avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS• <sup>+</sup> .....	49
Tabela 8 - Estimativa dos efeitos para o método de sequestro do cátion radical ABTS• <sup>+</sup> .....	50
Tabela 9 - Coeficientes de regressão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS• <sup>+</sup> .....	55
Tabela 10 - Tabela ANOVA para o método de sequestro do cátion radical ABTS• <sup>+</sup> .	55
Tabela 11 - Resultados para a determinação de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu	56
Tabela 12 - Estimativa dos efeitos para a determinação de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu .....	58
Tabela 13 - Coeficientes de regressão para a determinação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu .....	64
Tabela 14 - Tabela ANOVA para determinação do teor de compostos fenólicos.....	64
Tabela 15 - Resultados para a atividade antioxidante pelo método de FRAP .....	66
Tabela 16 - Estimativa dos efeitos para avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP .....	67
Tabela 17 - Coeficientes de regressão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP .....	72
Tabela 18 - Tabela ANOVA para avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP .....	72

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de calibração para o método de sequestro do radical DPPH• ....	39
Gráfico 2 - Teste de Tukey para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.....	41
Gráfico 3 - Gráfico de Pareto para o método de sequestro do radical DPPH• .....	43
Gráfico 4 - Meios preditos para a resposta sequestro do radical DPPH• .....	44
Gráfico 5 - Valores observados x preditos para o método de sequestro do radical DPPH• .....	45
Gráfico 6 - Gráfico de superfície de resposta para o método de sequestro do radical DPPH• .....	46
Gráfico 7 - Gráfico de calibração para o método de sequestro do cátion radical ABTS•+ .....	48
Gráfico 8 - Teste de Tukey para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS•+ .....	50
Gráfico 9 - Gráfico de Pareto para o método de sequestro do cátion radical ABTS•+ .....	51
Gráfico 10 - Meios preditos para a resposta sequestro do cátion radical ABTS•+ .....	52
Gráfico 11 - Valores observados x preditos para o método de sequestro do cátion radical ABTS•+.....	53
Gráfico 12 - Gráfico de superfície de resposta para o método de sequestro do cátion radical ABTS•+.....	54
Gráfico 13 - Gráfico de calibração para quantificação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu .....	56
Gráfico 14 - Teste de Tukey para a determinação do teor de compostos fenólicos – Folin-Ciocalteu .....	57
Gráfico 15 - Gráfico de Pareto para a determinação de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu .....	58
Gráfico 16 - Meios preditos para a determinação do teor de compostos fenólicos ...	59
Gráfico 17 - Meios preditos para a determinação do teor de compostos fenólicos ...	60
Gráfico 18 - - Valores observados x preditos para a determinação do teor de fenólicos totais - Folin-Ciocalteu.....	61
Gráfico 19 - Gráfico de superfície de resposta na determinação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu.....	62
Gráfico 20 - Gráfico de superfície de resposta na determinação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu.....	63
Gráfico 21 - Gráfico de calibração para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.....	65
Gráfico 22 - Teste de Tukey para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.....	67
Gráfico 23 - Gráfico de Pareto para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP .....	68
Gráfico 24 - Meios preditos para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.....	69
Gráfico 25 - Valores observados x preditos para avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP .....	70
Gráfico 26 - Gráfico de superfície de resposta na avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP .....	71
Gráfico 27 - Gráfico de Desejabilidade.....	73

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas e sua capacidade para tratamentos voltados a saúde humana é milenar, informações em grande parte empíricas, mas que já evidenciam o grande potencial que as mesmas carregam quando se trata de compostos bioativos. Este conhecimento popular impulsiona as pesquisas e serve como base para a descoberta de novos medicamentos (RODRÍGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2015).

A avaliação da capacidade biológica e terapêutica de plantas e de seus constituintes, tais como alcaloides, taninos e agentes antioxidantes, já foi comprovada em testes, assim confirmando que podem ser úteis e aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Dos constituintes a serem avaliados, destaca-se a importância dos agentes antioxidantes, que atuam na redução e inibição das lesões causadas por radicais livres nas células. Radicais livres são moléculas orgânicas ou inorgânicas que contêm elétrons não emparelhados e, por isso, são altamente instáveis e quimicamente muito reativas, com um tempo de vida muito curto. Quando presentes em excesso no organismo, os radicais livres podem causar danos aos tecidos e perda das funções dos órgãos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Em busca de uma matriz com grande capacidade biológica, uma planta que vem despertando o interesse de pesquisadores é a *Moringa oleifera* (Moringaceae), também conhecida como lírio-branco e quiabo-de-quina (EPAGRI, 2013). Esta árvore é originária da Índia e considerada uma planta com enorme capacidade biológica, as suas propriedades medicinais já são usadas no combate a hipertensão, tumores, artrite e outras doenças, e em algumas localidades é usada como reforço alimentar e para fins industriais. Essas propriedades medicinais são atribuídas à sua composição química, que apresenta compostos fenólicos e grande quantidade de vitaminas e sais minerais (RODRÍGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2015). A *Moringa oleifera* é vista com grande capacidade, pois praticamente todas as suas partes são ricas em compostos bioativos, como a raiz, casca, folhas, flores e frutos (EPAGRI, 2013).

De todas as partes da *M. oleifera*, as folhas são as que mais se destacam, e constituem parte mais abundante da planta, um estudo recente identificou que o seu extrato é rico em aminoácidos essenciais, fósforo, potássio e antioxidantes (RODRÍGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2015).

Portanto, considerando essas ricas propriedades, torna-se indispensável determinar um método de extração adequado que mantenha os extratos com teores máximos de seus compostos. Para determinar o método de extração adequado, evidencia-se a necessidade de bases científicas fornecidas por metodologias estatísticas (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Neste contexto, destaca-se o planejamento fatorial, em que são realizados experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores ou variáveis, e cada um desses experimentos é chamado de ensaio experimental. O planejamento fatorial tem por objetivo determinar quantitativamente a influência das variáveis escolhidas sobre a resposta de interesse, assim permitindo que os resultados sejam obtidos com o menor número de experimentos possíveis, culminando em economia de tempo e recursos (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Muitos fatores influenciam na extração de compostos antioxidantes em matrizes vegetais, dentre eles pode-se citar a natureza do vegetal, o tamanho das partículas que compõem este material, o solvente empregado na extração, o tempo de contato entre o solvente e o extrato e a temperatura do processo, gerando extratos que apresentam diferença quanto à atividade antioxidante e ao teor de compostos fenólicos (VONGSAK *et al.*, 2013).

Assim, o presente trabalho possui como objetivo determinar o método de extração adequado para a obtenção de compostos bioativos das folhas de *M. oleifera*, considerando a matriz de estudo e os compostos a serem extraídos. O método deve possuir boa aplicabilidade e ser eficaz, com viabilidade econômica e passível de ser estendido a maiores escalas.

## 1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA

A pesquisa delimita-se à otimização do processo de extração de compostos bioativos das folhas de *M. oleifera*. As variáveis independentes avaliadas são: concentração do solvente (etanol), temperatura e o tempo de extração. A atividade biológica será avaliada pelo método de determinação do teor de fenólicos totais, por meio do Folin-Ciocalteu, e da capacidade antioxidante, através dos métodos de Sequestro do radical estável orgânico 2,2'-difênil-1-picrilidrazila (DPPH·), Redução do

cátion radical 2,2'-azo-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>•+</sup>) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

## 1.2 HIPÓTESES

As variáveis temperatura, tempo de extração e composição do solvente influenciam na extração de compostos bioativos de matrizes vegetais. É possível determinar a melhor condição para a extração dos compostos com atividade antioxidante das folhas de *M. oleifera*.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral da pesquisa é: definir a melhor condição para a extração de compostos bioativos das folhas de *Moringa oleifera*.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

Para atender ao objetivo geral, estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- (i) Definir o teor de compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu em folhas de *M. Oleifera*;
- (ii) Determinar a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil);
- (iii) Estabelecer a atividade antioxidante pelo método de redução do cátion radical 2,2'-azo-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>•+</sup>);
- (iv) Avaliar a atividade antioxidante pelo método de redução do Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> (FRAP) (*Ferric Reducing Antioxidant Power*);



- (v) Analisar as variáveis de extração (temperatura, tempo de extração e composição do solvente) que podem influenciar nos teores dos compostos fenólicos totais e compostos com atividade antioxidante em folhas de *M. oleifera*, por meio da ANOVA;
- (vi) Analisar estatisticamente a significância das variáveis independentes em relação aos resultados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE PLANTAS

Uma das principais bases para o descobrimento e síntese de novos medicamentos é a medicina popular, sendo um dos requisitos primários na procura de substâncias biologicamente ativas em plantas. Há milhares de anos, as civilizações utilizam plantas para o tratamentos de diversas patologias e essa vasta experiência torna-se essencial nesse campo de pesquisa.

Com o avanço científico envolvendo elucidação estrutural e estudos farmacológicos de plantas com capacidades medicinais somado ao interesse científico no bem-estar e qualidade de vida da população, há uma motivação em torno da pesquisa e da identificação de substâncias naturais, que sejam benéficas ao organismo. Neste contexto, estas matrizes naturais têm se mostrado fontes valiosas para a descoberta de novos princípios ativos com boas capacidades biológicas. Os desafios agora remetem à busca por novos compostos bioativos naturais, que possam vir a substituir substâncias sintéticas na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos (OLDONI, 2010).

Um fator importante a ser avaliado na busca por novas matrizes é a grande diversidade de plantas existentes no planeta. Segundo dados, existem entre 250-500 mil espécies de plantas e uma pequena porcentagem apenas é estudada fitoquimicamente, e um percentual menor ainda, quando se fala de estudos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Mostrando que ainda há muitas substâncias a serem descobertas em matrizes naturais distintas.

#### 2.1.1 Obtenção de Princípios Ativos a partir de Plantas

Uma matriz natural contém metabólitos primários que estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos e metabólitos secundários ou especializados em sua composição, sendo que normalmente os metabólitos primários são os mais estudados, pois a sua detecção e identificação tornam-se mais fáceis, devido a alguns fatores, dentre eles,

a maior concentração na matriz. Entretanto em muitos casos os metabolitos que apresentam os melhores efeitos biológicos não são os de maior proporção, e sim os compostos em pequenas proporções, que tem seu estudo fitoquímico e isolamento dificultados, pois os procedimentos tornam-se mais complexos e demorados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Para a avaliação do potencial terapêutico de uma matriz natural é necessário a análise dos constituintes que possuem atividade biológica e dentre as atividades biológicas de produtos naturais, destaca-se a atividade antioxidante, que é a ação de combate às oxidações, tanto no organismo como em alimentos, bem como a natureza química dessas oxidações.

## 2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E NITROGÊNIO (ERN)

Os organismos vivos e alimentos em geral estão sujeitos à ação oxidativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), as quais podem causar uma série de doenças degenerativas como câncer em organismos vivos e a deterioração acentuada quando se trata de alimentos. Radicais hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ), peridroxil ( $\text{HOO}\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ânion superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) são exemplos de ERO's e óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) são exemplos de ERN's (ROLEIRA *et al.*, 2015).

Os seres vivos como organismos aeróbicos, necessitam de oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) para processos celulares essenciais. Como consequência desta necessidade para a respiração celular e, devido a algumas atividades enzimáticas essenciais, as células podem gerar algumas formas de oxigênio que são parcialmente reduzidas, as quais são denominadas como ERO. Para combater as ERO, formadas por processos vitais, o organismo humano possui mecanismos de controle e defesa, que ajudam a manter essas espécies em níveis adequados. Entretanto pode ocorrer a modificação ou degradação de compostos bioquímicos celulares quando a produção dessas espécies é em excesso, resultando no estresse oxidativo (OLIVEIRA, 2011).

Além dos processos vitais e da produção metabólica que é fundamentada na redução do  $\text{O}_2$ , há uma grande quantidade de agressores no meio que elevam a produção destas espécies reativas intracelularmente, como a queima de combustíveis fósseis, radiação solar ultravioleta, fumaça de cigarros e o uso de alguns tipos de

drogas por exemplo. Todos esses agressores representam um estresse oxidativo que nosso organismo não é capaz de combater e esses danos cumulativos induzidos pelo excesso dessas espécies, podem levar à perda funcional das células ou a própria morte celular. Motivo pelo qual essas ERO estão relacionadas diretamente ao envelhecimento precoce (SEN *et al.*, 2010).

O  $O_2$ , é reativo e se dispõe no estado fundamental triplete, porém nesse contexto de estresse oxidativo acumulado, pode dar origem a espécies ainda mais reativas, onde se inclui a produção de radicais livres.

### 2.2.1 Radicais Livres

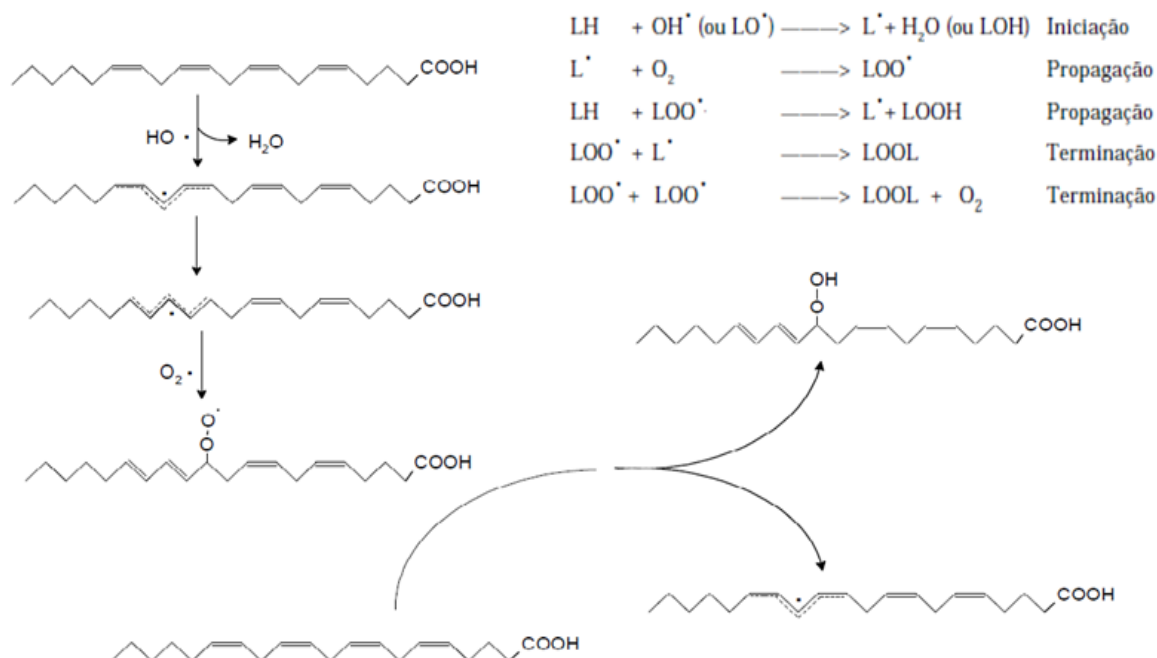
Elementos químicos são constituídos por camadas eletrônicas, essas são denominadas K, L, M, N, O, P e Q e os seus subníveis s, p, d, f. Quando um átomo ou molécula contém um número ímpar de elétrons em sua camada eletrônica, é definido como radical livre. É esse não emparelhamento de elétrons que confere uma alta reatividade a esses átomos ou moléculas, pois para se estabilizar “roubam” elétrons de qualquer molécula vizinha, oxidando-a. Esta oxidação ocasiona a deterioração de componentes dos alimentos e, no organismo, oxida componentes celulares. Lembrando que reação de redução implica em ganho de elétrons, e a de oxidação na perda de elétrons (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres tem funções importantes no organismo, seja na produção de energia ou na síntese de substratos biológicos. Entretanto, por terem uma alta reatividade, tendem a desencadear reações de oxidação com tais substratos, como proteínas, ácidos graxos poli-insaturados dos lipídios, RNA e DNA, danificando essas biomoléculas e afetando diretamente a saúde (ROLEIRA *et al.*, 2015).

### 2.2.2 Lipoperoxidação

As espécies reativas têm capacidade de atacar todos os componentes celulares, mas os ácidos graxos poli-insaturados da cadeia lipídica são os mais vulneráveis, devido ao fato da estrutura desses ácidos graxos conterem duplas ligações, que são mais susceptíveis a esses ataques. A oxidação dessas estruturas é

denominada de peroxidação lipídica e seu mecanismo é dividido em três principais etapas: iniciação, propagação e terminação conforme segue no Esquema 1 (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997).



**Esquema 1 - Peroxidação Lipídica**

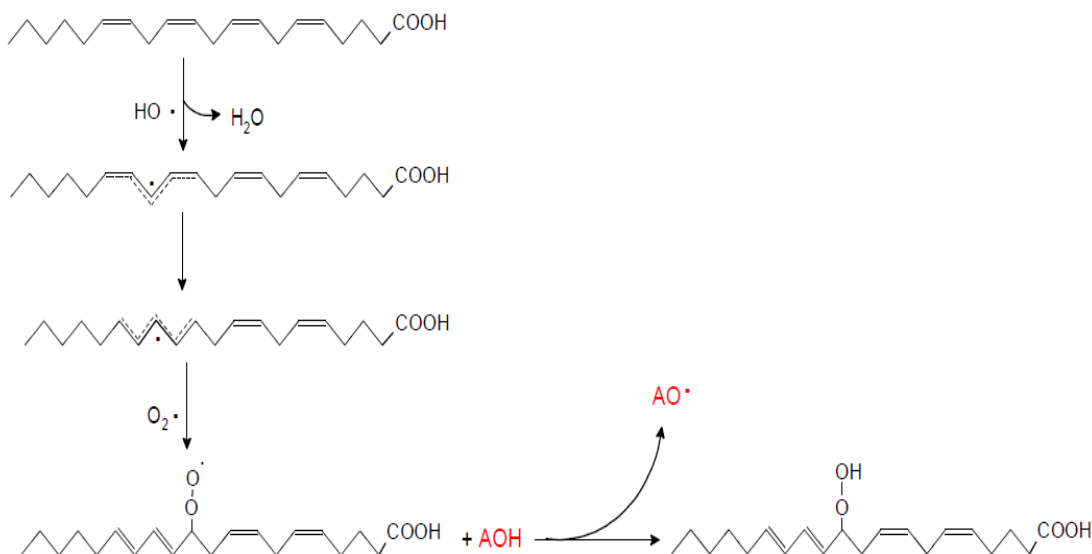
Fonte: Adaptado de Ferreira e Matsubara (1997) e Oliveira (2011).

Conforme observado no Esquema 1, a iniciação acontece, pois o radical livre altamente reativo deve abster o hidrogênio nos sítios mais suscetíveis, transformando essa estrutura estável do ácido graxo em um centro radicalar instável. Na próxima etapa acontece a propagação, já que esse novo centro radicalar pode reagir com qualquer estrutura na membrana celular, porém a reação mais provável é com o oxigênio ( $O_2$ ), assim originando o radical peróxido. O radical lipídico e peróxido formados nas etapas de iniciação e propagação podem continuar abstraindo um novo hidrogênio da cadeia lipídica continuando as reações em cadeia radicalar, ou podem se propagar até se destruírem, etapa essa definida como terminação (OLIVEIRA, 2011).

Esse mecanismo de oxidação lipídica afeta e causa alteração na membrana celular, alterando sua estrutura e permeabilidade, que acaba gerando a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, assim culminando na morte celular. Por conta da morte celular, estas oxidações estão diretamente relacionadas a mecanismos de envelhecimento e de desenvolvimento de disfunções

reprodutivas celulares, como é o caso do câncer (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação pode ser retardada ou inibida por agentes com capacidade antioxidante, como mostra o Esquema 2, os quais interrompem a etapa de propagação da peroxidação, desta forma gerando um hidroperóxido estável e um radical livre, que é formado a partir do antioxidante (OLIVEIRA, 2011).



**Esquema 2- Interrupção da cadeia radicalar na peroxidação lipídica por um antioxidante (AOH)**  
**Fonte: Oliveira (2011).**

### 2.3 AGENTES ANTIOXIDANTES

Uma definição abrangente do termo antioxidante, que envolve todos os substratos oxidáveis, é a seguinte: “qualquer substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração comparada a substância oxidável de interesse” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Os antioxidantes podem ser originados a partir de substâncias naturais ou sintéticas, sendo que hoje, dentro da indústria alimentícia, os mais utilizados sejam os sintéticos. Órgãos responsáveis pelo controle de substâncias estabelecem limites de ingestão diária para seres humanos e limites de quantidades em alimentos. Portanto, estão sujeitos a legislações específicas de cada país ou órgão responsável, ou unificados em normas internacionais (TIVERON, 2010).

Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria, destacam-se o butilidroxianisol (BHA), o butilidroxitolueno (BHT) e o propil galato (PG), usados na indústria de óleos e derivados lipídicos, agindo como conservantes. Todavia, sabe-se que tais antioxidantes sintéticos podem apresentar alguns efeitos adversos e nocivos à saúde. Neste contexto, torna-se evidente a importância da busca em obter substâncias naturais, que apresentem funções para inibir ou retardar as oxidações, podendo ainda apresentar vantagens funcionais (OLIVEIRA, 2011).

Antioxidantes naturais são compostos extraídos a partir de matrizes naturais, dentre os quais destacam-se os compostos fenólicos, o ácido ascórbico, os carotenóides e algumas vitaminas.

### 2.3.1 Compostos Fenólicos

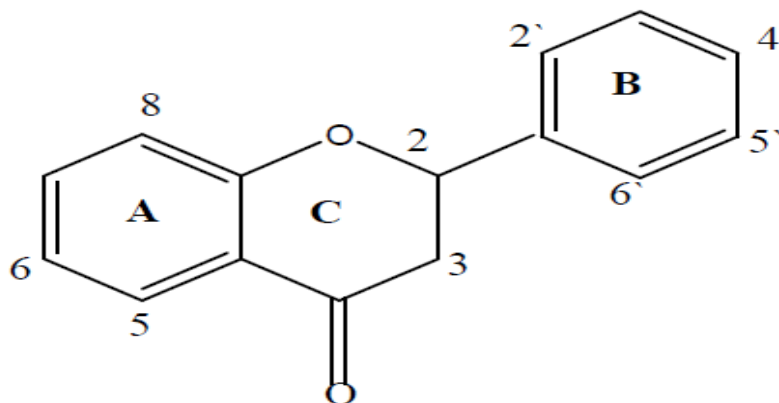
São os antioxidantes mais abundantes da dieta humana, caracterizados por uma estrutura de anel aromático, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. São encontrados em sua grande maioria na natureza sob a forma de heterosídeos e ésteres, assim os tornando solúveis em solventes orgânicos polares e água. A característica antioxidante dos compostos fenólicos deve-se as propriedades de oxirredução que esses compostos apresentam, portanto, absorvem e neutralizam radicais livres, ERO e atuam na decomposição de peróxidos (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides, sendo ambos oriundos do metabolismo especializado das plantas.

#### 2.3.1.1 Flavonoides

São pigmentos naturais presentes em plantas, capazes de ajudar na proteção do organismo contra danos por agentes oxidantes, como por exemplo: raios ultravioleta, poluição ambiental, contaminação de alimentos por produtos químicos. Flavonoides são ácidos fracos com características polares, solúveis em etanol, metanol, butanol e em combinações de solventes com água. Compostos que

apresentam um baixo peso molecular, e tem em comum um anel pirano (C), que liga dois anéis aromáticos (A e B), sendo um difenilpirano C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, como segue na Figura 1 (DORNAS *et al.*, 2007).



**Figura 1 - Estrutura Básica dos Flavonoides**  
 Fonte: (DORNAS *et al.*, 2007)

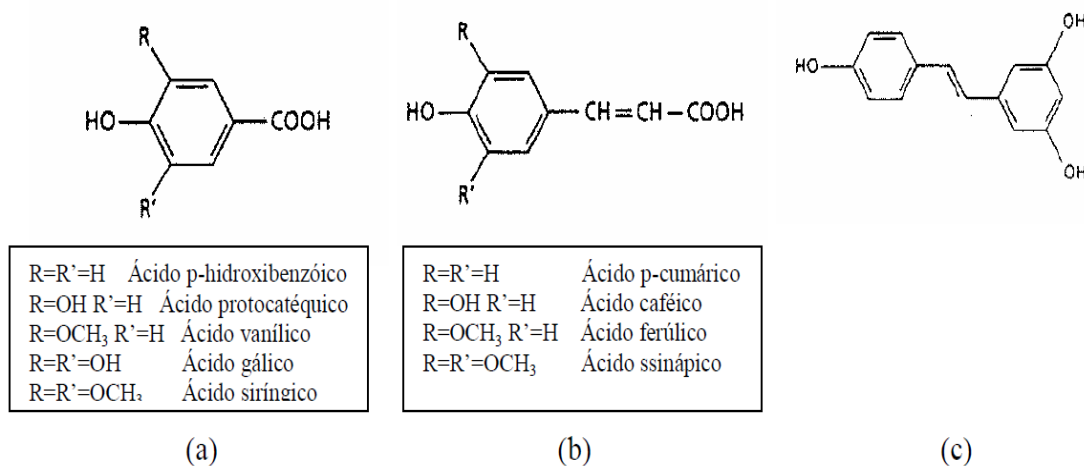
Os flavonoides apresentam ótima efetividade como agente antioxidante, e são encontrados nos vacúolos celulares das plantas, estando assim, presentes em todas as partes das matrizes naturais. Nas plantas, os flavonoides desempenham importante defesa frente à diversos agentes capazes de danificar a planta, como por exemplo: insetos, geadas, grandes volumes de chuva, radiação ultravioleta etc. A radiação ultravioleta é um dos mais pertinentes agentes estressantes em uma matriz natural e a quantidade de flavonoides encontrados é diretamente proporcional a classe da planta e a necessidade ou não de defesas contra os raios ultravioleta. Assim, quando há ausência de raios ultravioleta, as plantas tendem a ter uma concentração menor de flavonoides (OLIVEIRA, 2011).

Os flavonoides possuem grandes efeitos bioquímicos e farmacológicos, além da atividade antioxidante, apresentam atividade antiinflamatória, antialérgica e são eficazes na inibição de enzimas degradadoras e estímulo a enzimas desintoxicantes no organismo humano (FATIMA *et al.*, 2009).



### 2.3.1.2 Não flavonoides

Os compostos fenólicos mais simples são chamados de não flavonoides. Os ácidos fenólicos tem base estrutural (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), ácidos fenilacéticos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>), ácidos cinâmicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) e estilbeno (resveratrol) (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>). Fazem parte destes grupos os ácidos benzoicos que têm uma cadeia estrutural do tipo (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) como o *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílico, gálico e siríngico, Figura 2a. Os ácidos cafeico, ferúlico, sinápico e *p*-cumárico também fazem parte deste grupo, e são representados por uma cadeia lateral insaturada (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) que aparece na Figura 2b, e o resveratrol (trans-3,5,4-trihidroxiestilbeno) Figura 2c (ROBARDS *et al.*, 1999).



**Figura 2 - Não Flavonoides - Estrutura e Nome**  
**Fonte: (FATIMA *et al.*, 2009).**

## 2.4 MATRIZ NATURAL DE ESTUDO – *Moringa oleifera*

Em busca de uma matriz com grande capacidade biológica, destaca-se a planta *Moringa oleifera*, conhecida popularmente como lírio-branco. Esta árvore é originária da Índia e cresce cerca de três a quatro metros por ano, se adaptando a climas tropicais e subtropicais de solos férteis e preferencialmente alcalinos e podendo chegar a doze metros de altura. É considerada uma planta com enorme capacidade biológica e por suas propriedades medicinais é usada no combate a hipertensão, tumores, artrite e outras doenças, e em algumas localidades é usada

como reforço alimentar e para fins industriais. Essas propriedades medicinais são atribuídas à sua composição, contendo compostos fenólicos e grande quantidade de vitaminas e sais minerais, como exemplo contém quatro vezes a quantidade de vitamina A presentes nas cenouras, e quatro vezes a quantidade de cálcio presente no leite - (Figura 3). A *M. oleifera* é vista com grande capacidade, pois praticamente todas as suas partes são ricas em compostos antioxidantes, como a raiz, casca, folhas, flores e frutos (EPAGRI, 2013).

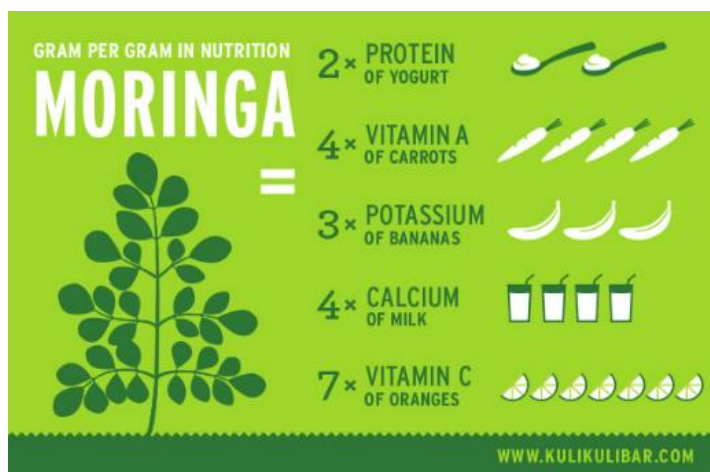


Figura 3 - Comparação de nutrientes encontrados na *M. oleifera* com outras fontes conhecidas  
Fonte: <https://www.kulikulifoods.com/moringa>

Em particular, as folhas da *M. oleifera* podem ser consumidas frescas em saladas ou cozidas e, ainda, armazenadas como um pó seco durante muitos meses sem perda do valor nutricional (Figura 4). Além disso, um estudo recente identificou que o extrato possui riqueza em aminoácidos essenciais, fósforo, potássio e antioxidantes (RODRÍGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2015).



**Figura 4 - Folhas e pó das folhas da *Moringa oleifera***

Fonte: <http://greatlifeandmore.com/index.php/2015/07/06/the-amazing-health-benefits-of-moringa-oleifera/>

Portanto, levando em consideração o potencial farmacológico das folhas de *M. oleifera*, torna-se indispensável a determinação de um método que permita extrair ao máximo seus compostos bioativos, visando constantemente à aplicabilidade industrial e na pesquisa.

## 2.5 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

O método de extração deve apresentar algumas características para ser considerado o ideal. Deve ser o método mais simples possível, portanto evitando procedimentos desnecessários ou não viáveis, que acabam por tornar o processo moroso. Deve-se avaliar o aspecto econômico de extração, que possibilite que esse método possa ser reproduzido em maiores escalas (RODRÍGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2015).

Nesse contexto, evidencia-se a importância do conhecimento de ferramentas que aperfeiçoem esses métodos e possam elucidar a exata influência na resposta que cada alteração do nível do fator possa gerar. Assim possibilitando o desenvolvimento de relações matemáticas e estatísticas de inferência que possam ser aplicadas na análise do conjunto de dados.

O planejamento fatorial é uma ferramenta utilizada para desvendar a influência direta dos fatores ou variáveis independentes sobre as respostas desejadas e é fundamentado em princípios estatísticas que levam a maior confiabilidade no fornecimento de informações do que por métodos aleatórios. Nesse contexto, o

planejamento fatorial permite a redução no número de ensaios experimentais. Esta metodologia também analisa a influência simultânea, de vários fatores.

O método consiste em realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores ou variáveis, onde cada um desses experimentos é chamado de ensaio experimental (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

## 2.6 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Muitos fatores influenciam a extração de compostos antioxidantes em matrizes vegetais, sendo de extrema dificuldade definir um único método ideal para todos as extrações. Dentre os fatores pode-se citar a natureza do vegetal, o tamanho das partículas, o solvente empregado na extração, o tempo de contato entre o solvente e o extrato e a temperatura do processo, gerando extratos que apresentam diferença quanto à atividade antioxidante e ao teor de compostos fenólicos (VONGSAK *et al.*, 2013).

O tipo de solvente e sua polaridade têm influência direta e podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é determinante na medida da capacidade antioxidante (OLDONI, 2010). O rendimento da extração e a variação na composição do mesmo dependem tanto do solvente utilizado quanto do método aplicado, que pode ser baseado em diferentes mecanismos. No isolamento de compostos bioativos, os solventes orgânicos são frequentemente mais utilizados, como etanol, água e metanol. A mistura desses solventes acarreta em uma melhor solubilidade dos compostos bioativos de interesse no extrato da matrizes vegetais (ANDREO; JORGE, 2006).

O tempo de contato entre o extrato e o solvente é outro fator importante a ser avaliado na extração de compostos de matrizes vegetais, de acordo com Andreo, Jorge (2006) “Longos períodos de extração aumentam a possibilidade de oxidação dos compostos fenólicos”.

A temperatura tem influência direta no processo de extração dos compostos bioativos. Em alguns casos, dependendo da natureza do composto, o aumento da temperatura pode ocasionar a degradação dos mesmos, acarretando na perda no

rendimento da extração. Termodinamicamente, as taxas de difusão e solubilidade dos analitos tem um aumento significativo, diretamente proporcional ao aumento da temperatura e inversamente proporcional ao aumento da temperatura a tensão superficial e a viscosidade diminuem. Essas alterações diminuem as barreiras de contato entre o solvente e os analitos, conseqüentemente acelerando o processo de extração (ERDOGAN *et al.*, 2011).

## 2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

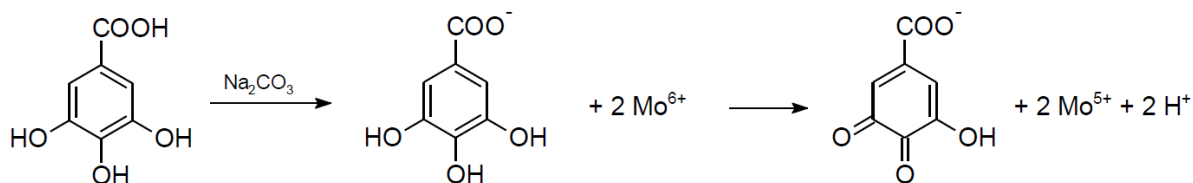
Há um grande número de metodologias para a determinação da atividade antioxidante de alimentos e de produtos naturais nos dias atuais, devido ao reconhecimento benéfico desta atividade para a saúde. Com o objetivo de encontrar um método de fácil reprodução, rápido e que necessite de pequenas quantidades de reagente, e que não seja afetado pelas propriedades físicas do composto, por exemplo (OLDONI, 2010). Entretanto, os métodos têm fundamentos e mecanismos de ação e maneiras de expressar os resultados totalmente distintos, o que torna complicado escolher o melhor método. Nesse contexto devem-se escolher os métodos comumente aceitos, validados e padronizados já existentes na literatura (TIVERON, 2010).

### 2.7.1 Método de Avaliação do Conteúdo Total de Compostos Fenólicos – Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu consiste na avaliação do conteúdo total de compostos fenólicos em matrizes. Esse método consiste na reação dos compostos fenólicos com o reagente de folin-ciocalteu, que é composto por uma mistura de ácidos de tungstênio (W) e molibdênio (Mo) no estado de oxidação (VI), ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) apresentando coloração amarela. Na presença de agentes redutores, que são os compostos fenólicos, formam-se os complexos de tungstênio e molibdênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$  (SOUSA *et al.*, 2007).

A reação de oxirredução ocorre em meio alcalino, com adição de carbonato de cálcio. A reação ocorre entre os ânions que são gerados a partir da desprotonação

dos compostos fenólicos e o reagente de folin-ciocalteu, fazendo com que o molibdênio ( $\text{Mo}$ ) sofra redução (Esquema 3). A coloração do meio reacional é alterada de amarela para azul, gerando assim um sinal que pode ser detectado por espectrofotometria, e que permite a determinação da concentração de compostos fenólicos no meio (OLIVEIRA, 2011).

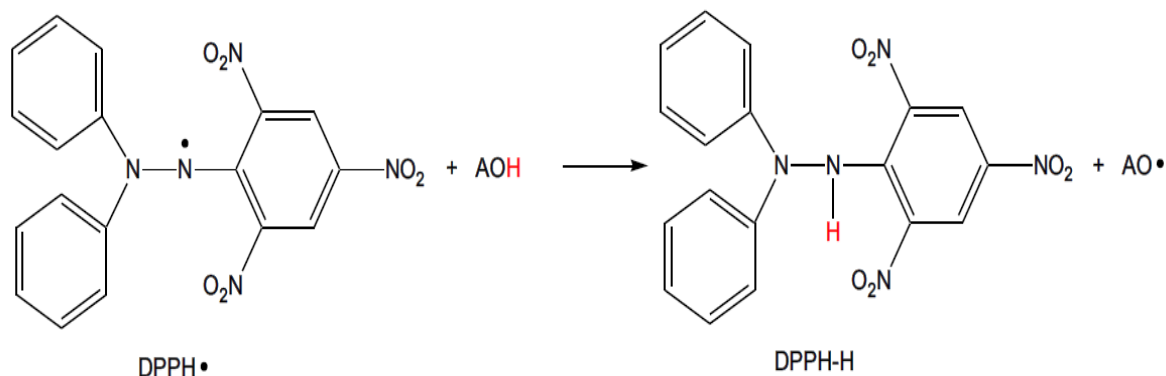


**Esquema 3 - Reação do ácido gálico reduzindo o Molibdênio (Mo) em meio alcalino.**  
**Fonte: (OLIVEIRA, 2011)**

### 2.7.2 Método de Avaliação da Capacidade Antioxidante – Sequestro do Radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O método consiste na medida da habilidade de um composto antioxidante em reduzir o radical DPPH•. O DPPH• é um radical orgânico de nitrogênio vendido comercialmente, que tem por característica ser estável. Sua cor é violeta e possui absorção máxima na faixa de 515nm. Este método permite ensaios rápidos, simples, precisos e com boa reprodutibilidade e não necessita de altas temperaturas (OLDONI, 2010).

O radical DPPH• quando entra em contato com o antioxidante (AOH), sofre redução e é estabilizado (Esquema 4). Como consequência, ocorre a descoloração da solução para amarelo pálido, extinguindo a banda de absorção em 515nm. Essa mudança pode ser monitorada espectrofotometricamente pela variação da absorbância do sistema.

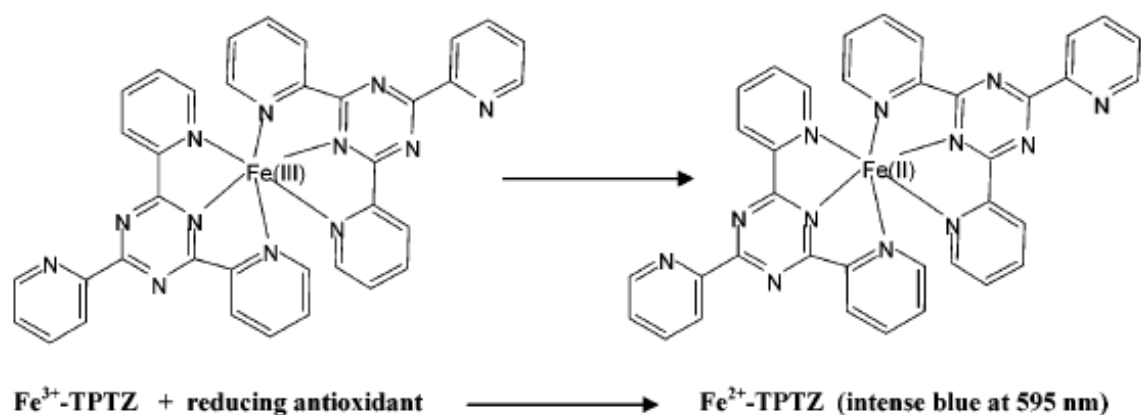


**Esquema 4 - Reação entre o radical estável (DPPH•) e um agente antioxidante**  
 Fonte: (OLIVEIRA, 2011)

### 2.7.3 Método de Avaliação da Capacidade Antioxidante – FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

O método do FRAP é um indicador da atividade antioxidante, considerado como simples e de baixo custo. Muitos estudos em matrizes alimentícias, bebidas e plantas, utilizam o método FRAP em conjunto com outros ensaios para determinação da atividade antioxidante. O método é baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , portanto envolve reações de transferência de elétrons (TIVERON, 2010).

A reação ocorre com a formação de um complexo de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) com o  $\text{Fe}^{3+}$ , cuja cor é amarela. Quando adicionado um antioxidante, o ferro é reduzido, dando origem ao  $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  (Esquema 5), de coloração azul e absorção máxima em 593nm. Esta reação ocorre em pH ácido, entre 3 e 4.



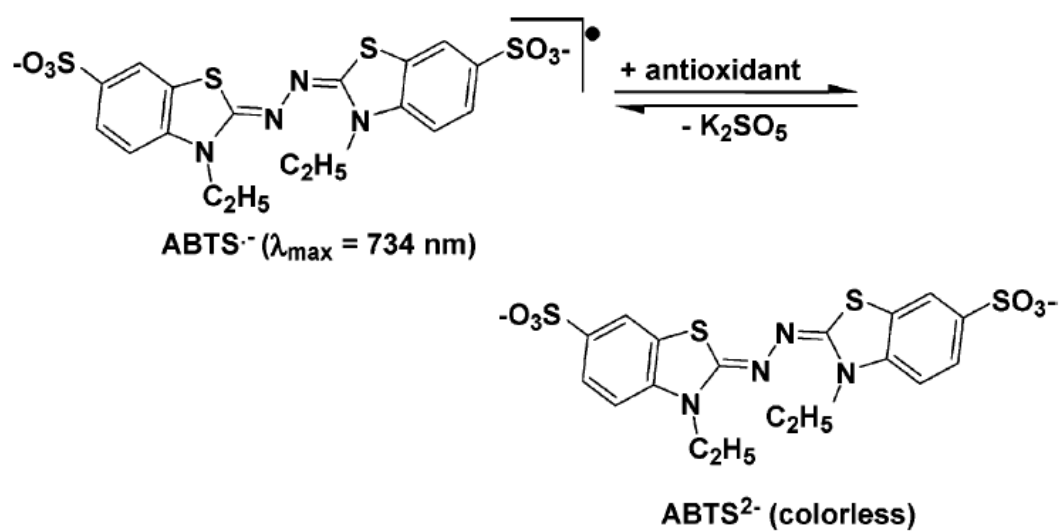
**Esquema 5: Redução do Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup> na presença de um agente antioxidante (AOH)  
Fonte: (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005)**

#### 2.7.4 Método de Avaliação da Capacidade Antioxidante - Redução do Cátion Radical ABTS•<sup>+</sup> (2,2-azo-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato))

O cátion radical ABTS•<sup>+</sup> é gerado por reações químicas ou enzimáticas e é um dos métodos mais utilizados para avaliação da atividade antioxidante em matrizes naturais. O cátion ABTS•<sup>+</sup> é solúvel em água e em ácidos orgânicos, portanto diferencia-se dos demais métodos pela capacidade de avaliação de amostras de natureza hidrofílicas e lipofílicas (DARONCHO, 2012).

O radical ABTS•<sup>+</sup> é formado pela reação com persulfato de potássio e tem coloração azul-esverdeada. Na presença de um agente antioxidante o radical se reduz (Esquema 6), ocasionando uma mudança na coloração do meio reacional, assim sendo possível ser determinada espectrofotometricamente pela absorvância a 734nm. Os resultados são obtidos com a leitura da absorvância da amostra comparada com a absorvância do antioxidante sintético trolox, usado como padrão (OLDONI, 2010).





Esquema 6 - Formação do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  na presença de persulfato de potássio e redução por um agente antirradicalar.

Fonte: (HUAN, PRIOR, 2005)

### 3 MATÉRIAS E METÓDOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *M. oleifera* foram fornecidas pela EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, localizada no município de Itajaí, estado de Santa Catarina. As folhas foram secas em estufa com circulação de ar forçada, regulada a uma temperatura de 40-45 °C, moídas em liquidificador e armazenadas sob refrigeração até as análises.

#### 3.2 DESIGN EXPERIMENTAL – PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup>

A otimização das condições de extração de compostos bioativos das folhas de *M. oleifera* foi realizada utilizando planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup>. As variáveis independentes a serem estudadas e alteradas foram a concentração do solvente (etanol), temperatura e tempo da extração. As variáveis dependentes foram o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Os dados foram analisados por meio da metodologia de superfície de resposta

O planejamento fatorial foi selecionado para cada variável do processo de otimização em três níveis com onze experimentos, incluindo repetições em triplicata no ponto central (Tabela 1). Sendo que o índice (-1) representa o menor nível, o índice (0) representa a média entre o maior e o menor nível e o índice (+1) representa o maior nível da variável em questão.

**Tabela 1 - Variáveis independentes e seus níveis - Planejamento Fatorial**

Amostra	Variável 1: Concentração do solvente (%)	Variável 2: temperatura (°C)	Variável 3: tempo (min)
1	30 (-1)	30 (-1)	15 (-1)
2	80 (+1)	30 (-1)	15 (-1)
3	30 (-1)	70 (+1)	15 (-1)
4	80 (+1)	70 (+1)	15 (-1)
5	30 (-1)	30 (-1)	45 (+1)
6	80 (+1)	30 (-1)	45 (+1)
7	30 (-1)	70 (+1)	45 (+1)
8	80 (+1)	70 (+1)	45 (+1)
9	55 (0)	50 (0)	30 (0)
10	55 (0)	50 (0)	30 (0)
11	55 (0)	50 (0)	30 (0)

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

### 3.3 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

O processo para obtenção dos extratos de *M. oleifera* foi baseado no método proposto por Rodríguez-Pérez *et al.* (2015) com modificações. Cada ensaio consiste em pesar 2,0 g de *M. oleifera* seca e triturada e adicionar 25 mL de solvente etanol/água na concentração correspondente previamente definidas.

Em seguida, cada amostra ficou sobre ação de temperatura e agitação durante um tempo definido para cada ensaio. A temperatura a que cada amostra foi submetida foi definida pelo planejamento fatorial (Tabela 1) em banho de aquecimento (banho-maria) digital. Após, os extratos foram submetidos a centrifugação a 2400 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos para a separação da fração sólida e da aquosa. A remoção completa dos sólidos foi obtida ao filtrar as amostras usando uma bomba compressora a vácuo. Os extratos foram armazenados em tubo Falcon graduados de 50 mL sob refrigeração de aproximadamente -10 °C até o momento das análises.

### 3.4 METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS – FOLIN-CIOCALTEAU

O procedimento para a quantificação do teor de fenólicos totais presente no extrato da planta foi realizada em triplicata, utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999), com modificações. O método consiste na mistura de 0,5 mL do extrato com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) na concentração de 4%. A mistura foi deixada em incubação no escuro durante um período de 120 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, realizadas as leituras da absorbância em espectrofotômetro a 740 nm (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

Para a quantificação do conteúdo de fenólicos totais, foi construída uma curva analítica utilizando o ácido gálico como padrão, o resultado expresso em mg de equivalente ácido gálico por grama de amostra ( $\text{mg EAG.g}^{-1}$ ). As amostras foram

diluídas 1:50 (v/v) em solvente na mesma concentração utilizado na extração e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de EAG por grama de amostra

### 3.5 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – SEQUESTRO DO RADICAL DPPH• (2,2-DIFENIL-1-PICRILIDRAZIL)

A determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• foi realizada segundo metodologia descrita por Brand-Willians *et al* (1995).

A técnica de avaliação consiste na adição de 0,5 mL do extrato de *M. oleifera*, 3 mL de etanol P.A e 0,3 mL da solução do radical de DPPH•  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Em seguida, a mistura de reação foi deixada em repouso durante o período de 60 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 517 nm, utilizando etanol P.A para confecção do branco analítico. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica utilizando trolox, o resultado foi expresso em  $\mu\text{mol}$  de trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ ) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

As amostras foram diluídas 1:200 (v/v) em solvente na mesma concentração utilizado na extração, e todas as análises foram feitas em triplicata, utilizada a média ponderada nos cálculos.

### 3.6 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – FRAP (*FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER*)

A metodologia para avaliação da capacidade antioxidante através de redução do ferro (FRAP) foi proposta por Benzie e Strain (1996), com modificações. O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) na concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  e 2,5 mL de cloreto de ferro em solução aquosa na concentração de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , sendo necessário preparar apenas na hora da utilização evitando a degradação.

O método consiste na mistura de 0,1 mL do extrato de *M. oleifera* com 3 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria à  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min e em seguida foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro

a 595 nm. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica utilizando sulfato ferroso como padrão, o resultado foi expresso em  $\mu\text{mol}$  de sulfato ferroso por grama de amostra ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ ) (BENZIE; STRAIN, 1996). As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em solvente na mesma concentração utilizado na extração, e todas as análises foram feitas em triplicata.

### 3.7 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS $\bullet^+$ (2,2-AZO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-SULFONATO))

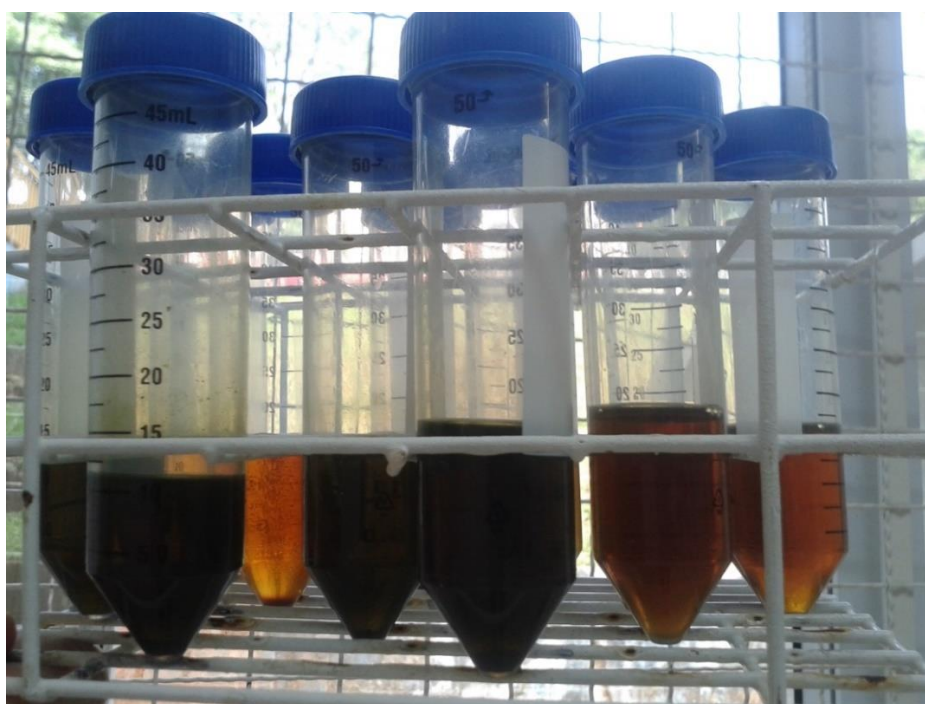
A metodologia utilizada para a captura do cátion radical ABTS $\bullet^+$  foi descrita por Re *et al* (1999), com algumas modificações. O cátion radical ABTS $\bullet^+$  foi formado pela reação de 5 mL de ABTS na concentração de 7  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  com 8,8  $\mu\text{L}$  de persulfato de potássio na concentração de 140  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , incubados em temperatura ambiente por 16 horas na ausência de luz. Após a incubação, a solução foi diluída em etanol P.A até absorvância de aproximadamente  $0,700 \pm 0,200$  à 734 nm.

O método consiste na adição de 0,03 mL do extrato de *M. oleifera* e 3 mL do radical formado, tendo como branco etanol P.A. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm após 6 minutos de reação. Para a quantificação será construída uma curva analítica utilizando o antioxidante trolox como padrão, o resultado foi expresso em  $\mu\text{mol}$  de trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (RE *et al.*, 1999). As amostras foram diluídas 1:100 (v/v) em solvente na mesma concentração utilizado na extração, e todas as análises foram feitas em triplicata, utilizada a média ponderada nos cálculos.

## 4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

A extração sólido-líquido das folhas da *Moringa oleifera* geraram extratos com colorações e tonalidades distintas. A polaridade do solvente, bem como sua concentração são alguns dos fatores que definem essa característica (ANDREO; JORGE, 2006). O nível de maior concentração do solvente etanol (+1) que corresponde a 80% etanol e 20% água, gerou extratos com uma coloração verde escuro intenso, e conforme a concentração do solvente etanol foi diminuindo, diminuiu-se a intensidade de tonalidade dos extratos (Figura 5).



**Figura 5 - Extratos obtidos para a *Moringa oleifera*.  
Fonte: Dados da pesquisa (2016).**

A coloração verde escura dos extratos obtidos com o solvente etanol em seu nível mais alto, deve-se a polaridade do solvente utilizado, que proporcionou uma maior interação com a clorofila presente nas células fotossintéticas, assim maximizando a extração da clorofila presente em matérias vegetais como as folhas da *Moringa oleifera* (STREIT *et al.*, 2005). Apesar das características da clorofila como

agente biológico, tal tonalidade é apenas uma característica, não sendo determinante para definir qual extrato é mais rico em agentes antioxidantes.

#### 4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento fatorial na ordem de  $2^3$  foi utilizado para avaliar a influência das variáveis independentes sobre as respostas (variáveis dependentes) escolhidas na extração de compostos bioativos das folhas da *Moringa oleifera*. A Tabela 2 mostra os resultados do planejamento fatorial e as influências das variáveis sobre as respostas obtidas.

**Tabela 2 – Planejamento fatorial e dados experimentais sobre as variáveis dependentes para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•, redução do cátion radical ABTS•+, FRAP e teor de fenólicos totais**

Experimento	DPPH ( $\mu\text{mol de trolox g}^{-1}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol de trolox g}^{-1}$ )	Folin-Ciocalteau ( $\text{mg EGA g}^{-1}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ )
1	95,96 $\pm$ 1,35 <sup>e</sup>	330,93 $\pm$ 8,83 <sup>g</sup>	29,74 $\pm$ 0,09 <sup>f</sup>	643,00 $\pm$ 0,00 <sup>fg</sup>
2	153,65 $\pm$ 1,35 <sup>c</sup>	321,56 $\pm$ 4,41 <sup>g</sup>	27,65 $\pm$ 0,68 <sup>g</sup>	618,00 $\pm$ 7,07 <sup>g</sup>
3	108,46 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	388,75 $\pm$ 15,46 <sup>cdef</sup>	32,13 $\pm$ 0,14 <sup>e</sup>	714,25 $\pm$ 5,30 <sup>cd</sup>
4	<b>215,19 <math>\pm</math> 9,51<sup>a</sup></b>	445,00 $\pm$ 6,62 <sup>ab</sup>	34,39 $\pm$ 0,39 <sup>bc</sup>	731,75 $\pm$ 12,37 <sup>bc</sup>
5	129,13 $\pm$ 6,11 <sup>d</sup>	354,37 $\pm$ 11,04 <sup>fg</sup>	33,42 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	671,75 $\pm$ 5,30 <sup>ef</sup>
6	154,13 $\pm$ 0,67 <sup>c</sup>	421,56 $\pm$ 26,51 <sup>abcd</sup>	30,40 $\pm$ 0,54 <sup>ef</sup>	675,50 $\pm$ 3,53 <sup>e</sup>
7	196,44 $\pm$ 11,55 <sup>ab</sup>	380,93 $\pm$ 13,25 <sup>def</sup>	33,04 $\pm$ 0,24 <sup>cd</sup>	699,25 $\pm$ 5,30 <sup>de</sup>
8	188,75 $\pm$ 2,03 <sup>b</sup>	365,31 $\pm$ 0,00 <sup>efg</sup>	33,38 $\pm$ 0,44 <sup>cd</sup>	729,25 $\pm$ 8,83 <sup>bc</sup>
9	208,94 $\pm$ 0,67 <sup>ab</sup>	<b>463,75 <math>\pm</math> 11,04<sup>a</sup></b>	<b>38,97 <math>\pm</math> 0,78<sup>a</sup></b>	<b>803,00 <math>\pm</math> 10,60<sup>a</sup></b>
10	201,23 $\pm$ 4,75 <sup>ab</sup>	429,37 $\pm$ 2,20 <sup>ab</sup>	34,18 $\pm$ 0,19 <sup>bc</sup>	749,25 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>
11	156,54 $\pm$ 1,35 <sup>c</sup>	410,37 $\pm$ 2,20 <sup>bcde</sup>	35,26 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	748,00 $\pm$ 7,07 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa (2016)

A análise das resposta na Tabela 2 demonstra que o experimento 4, que corresponde aos níveis superiores (+1) das variáveis concentração do solvente e temperatura e o nível inferior (-1) da variável tempo foi o que apresentou maior resposta para a avaliação da capacidade antioxidante método de sequestro do radical DPPH•, obtendo uma extração máxima de 215,19  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ . O experimento 9 que corresponde ao ponto central (0) foi o que apresentou melhores respostas na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS•+ e FRAP, onde obteve-se valores máximos de 463,75  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$  e 803,00  $\mu\text{mol de FeSO}_4.\text{g}^{-1}$  respectivamente. Para o teor de fenólicos totais o valor máximo foi de 38,97 mg EAG.g<sup>-1</sup>, também obtida a partir do experimento 9, nas mesmas condições do ponto central (0).

A fim de investigar a influência das variáveis e suas interações que de fato são estatisticamente relevantes nas respostas, os dados obtidos foram submetidos a um tratamento estatístico utilizando o *software* STATISTICA versão 8.0.

#### 4.3 RESULTADOS PARA O MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH•

Após efetuar as leituras no espectrofotômetro e coletadas as absorbâncias da curva padrão e das amostras, foi plotado o gráfico de calibração (Gráfico 1) utilizando as absorbâncias da curva padrão, e através da equação da reta gerada foi possível calcular a concentração das amostras.

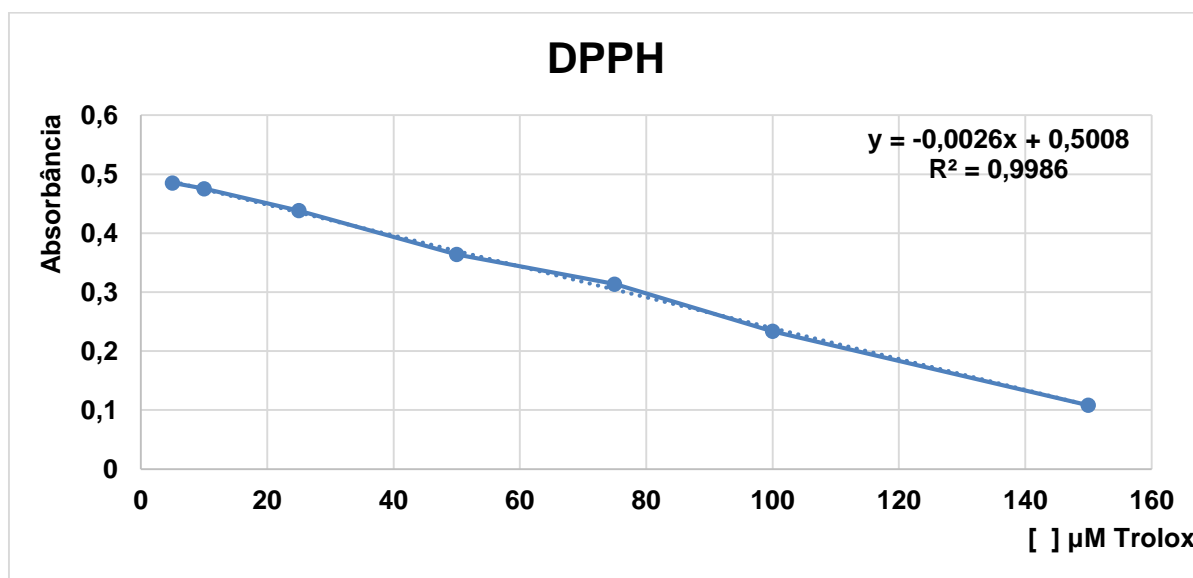


Gráfico 1 - Gráfico de calibração para o método de sequestro do radical DPPH•  
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A tabela 3 apresenta os resultados para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.



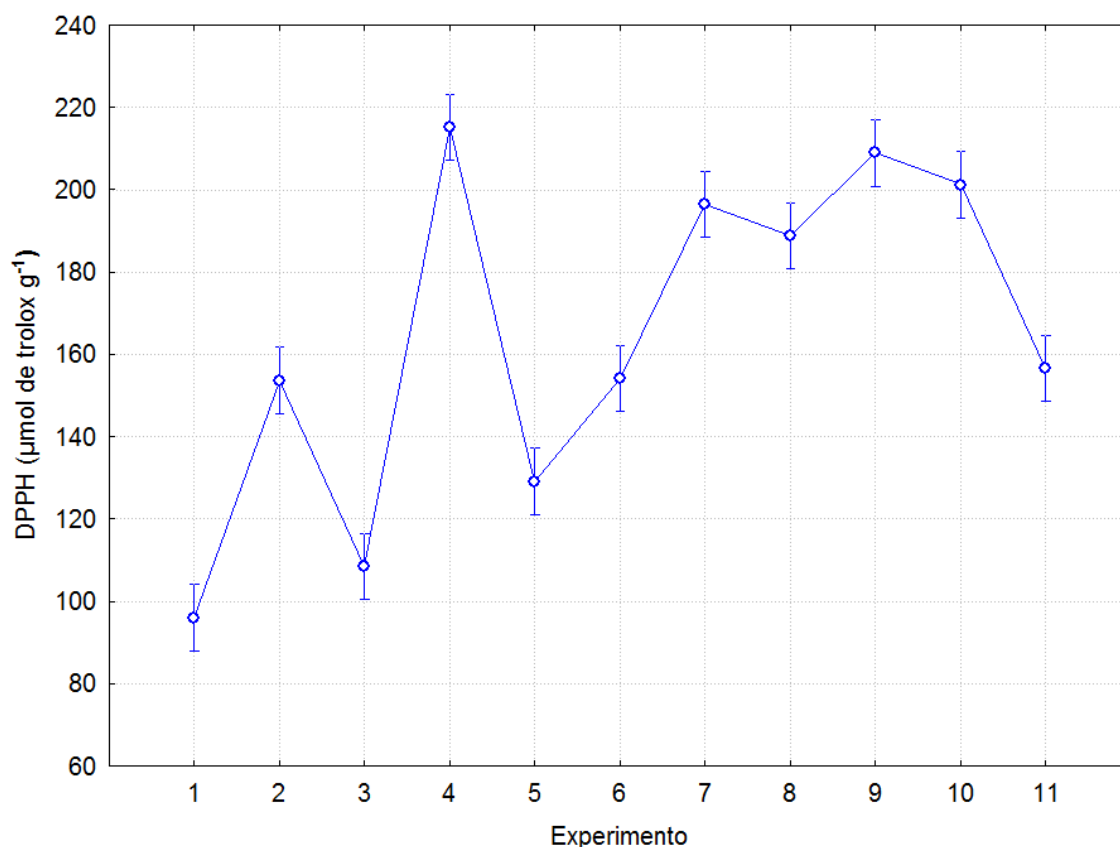
**Tabela 3 - Resultados para o método de avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•**

Experimento	DPPH ( $\mu\text{mol de trolox g}^{-1}$ )
1	95,96 $\pm$ 1,35 <sup>e</sup>
2	153,65 $\pm$ 1,35 <sup>c</sup>
3	108,46 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>
4	<b>215,19 <math>\pm</math> 9,51<sup>a</sup></b>
5	129,13 $\pm$ 6,11 <sup>d</sup>
6	154,13 $\pm$ 0,67 <sup>c</sup>
7	196,44 $\pm$ 11,55 <sup>ab</sup>
8	188,75 $\pm$ 2,03 <sup>b</sup>
9	208,94 $\pm$ 0,67 <sup>ab</sup>
10	201,23 $\pm$ 4,75 <sup>ab</sup>
11	156,54 $\pm$ 1,35 <sup>c</sup>

**Dados da Pesquisa (2016)**

Os resultados obtidos para o sequestro do radical DPPH•, apresentaram valores que variam entre 95,96 a 215,19  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ . A literatura traz alguns estudos sobre a *M. oleifera*, mas não foram encontrados trabalhos de avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• nestes moldes de análise, que expressa os valores em unidades de concentração do padrão escolhido (trolox) por grama de amostra. Gonçalves (2008) avaliou a capacidade antioxidante de frutas e obteve para o maracujá doce 21  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$  e para o tucumã 131  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ . Assim pode-se avaliar que extratos de *M. oleifera* são consideráveis e que a matriz contém grande capacidade antioxidante (GONÇALVES, 2008).

Os resultados foram submetidos ao teste de Tukey, a fim de investigar quais tratamentos estatisticamente diferem ou não entre si. A escala é representada por letras, onde os maiores valores das respostas seguem em ordem alfabética. A tabela 3 mostra que os experimentos 4, 7, 9 e 10 apresentam a letra “a”, assim, não apresentam diferença significativas entre si, pois experimentos com a mesma letra não são significativamente diferentes uns dos outros. Para melhor visualização dos resultados, o Gráfico 2 apresenta o teste de Tukey para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.



**Gráfico 2 - Teste de Tukey para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•**

**Fonte: Dados da Pesquisa (2016)**

A análise do Gráfico 2 permite visualizar que nos experimentos 4, 7, 9 e 10 as barras verticais se interceptam horizontalmente, portanto para um intervalo de confiança de 95%, os experimentos citados não apresentam diferenças entre si.

Para entender melhor o comportamento do sistema, o *software* STATISTICA fornece resultados sobre os efeitos das interações entre as variáveis, coeficientes de regressão e assim é possível verificar se os fatores (variáveis independentes) foram significativos. A tabela 4 apresenta os valores do efeito da curvatura e das variáveis independentes e suas interações para o sequestro do radical DPPH•.

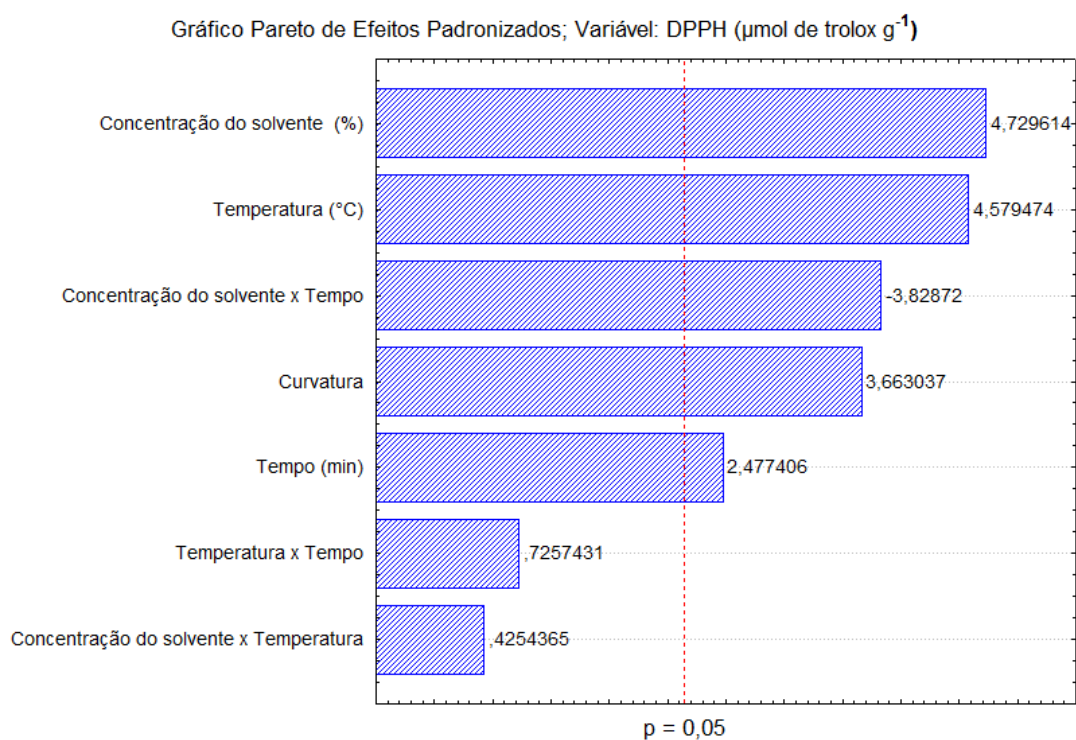
Tabela 4 - Estimativa dos efeitos para o método de sequestro do radical DPPH•

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t <sub>calc</sub>	p-valor	Limite de confiança (-) 95%	Limite de confiança (+) 95%
Modelo	155,2160	4,80301	32,31642	0,000000	144,9146	165,5174
Curvatura	67,3783	18,39412	3,66304	0,002558	27,9269	106,8298
[EtOH] (%)	45,4328	9,60602	4,72961	0,000323	24,8299	66,0356
Temperatura (°C)	43,9905	9,60602	4,57947	0,000429	23,3876	64,5934
Tempo (min)	23,7980	9,60602	2,47741	0,026602	3,1951	44,4009
[EtOH] x Temperatura	4,0868	9,60602	0,42544	0,676986	-16,5161	24,6896
[EtOH] x Tempo	-36,7788	9,60602	-3,82872	0,001843	-57,3816	-16,1759
Temperatura x Tempo	6,9715	9,60602	0,72574	0,479953	-13,6314	27,5744

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

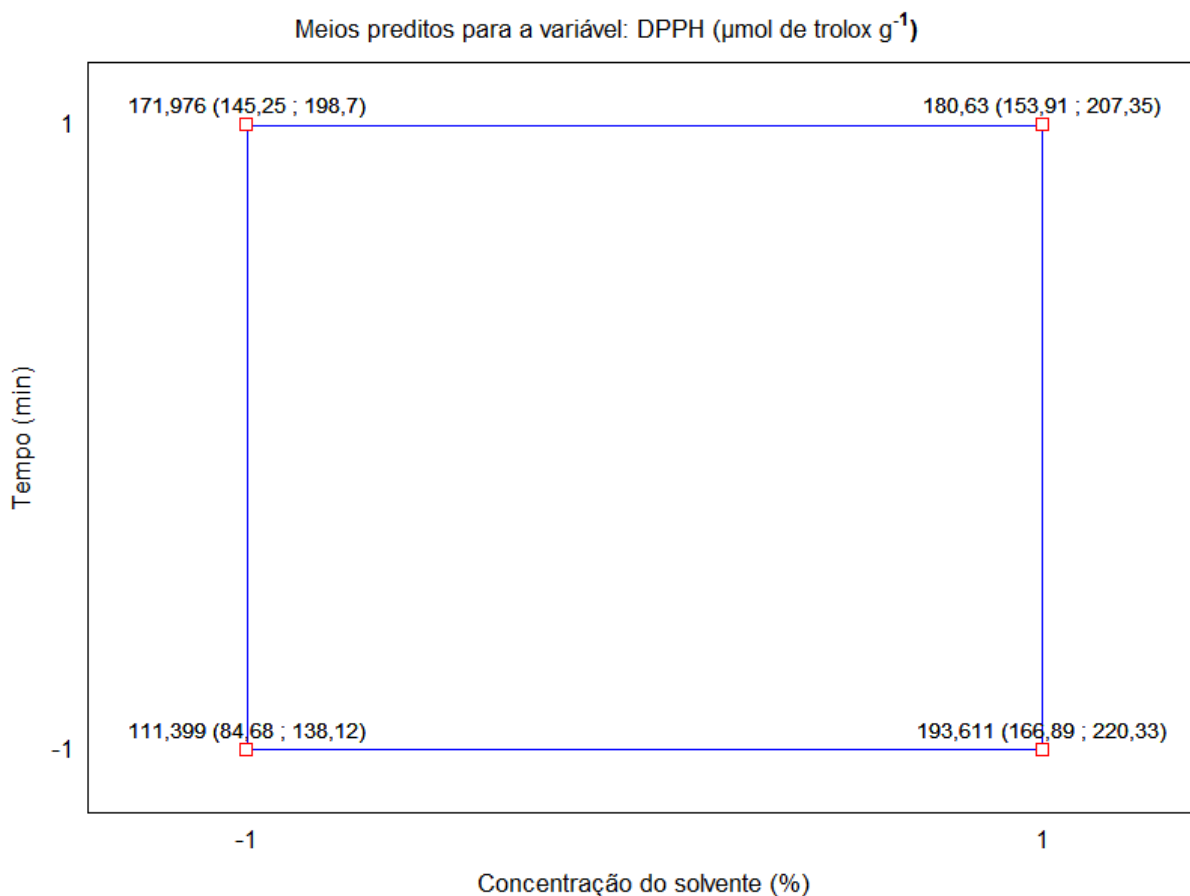
O p-valor pode variar de 0 à 1 e representa a probabilidade ou chance do efeito observado pelas variáveis ser devido ao acaso, e não aos fatores que estão sendo avaliados. Para que os efeitos observados sejam significativos estatisticamente o p-valor deve ser menor ou igual a 0,05 assumindo como margem de segurança 5% de chances de erro (FERREIRA; PATINO, 2015). Portanto estatisticamente para o método de sequestro do radical DPPH•, o modelo experimental, a curvatura e todas as variáveis independentes (concentração do solvente, tempo e temperatura) foram significativas, além da interação entre concentração do solvente e tempo (linhas em vermelho na Tabela 4).

Com o Gráfico de Pareto (Gráfico 3), é possível uma melhor compreensão visual, a linha tracejada indica a região onde as variáveis devem alcançar para demonstrar significância estatística.



**Gráfico 3 - Gráfico de Pareto para o método de sequestro do radical DPPH•**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

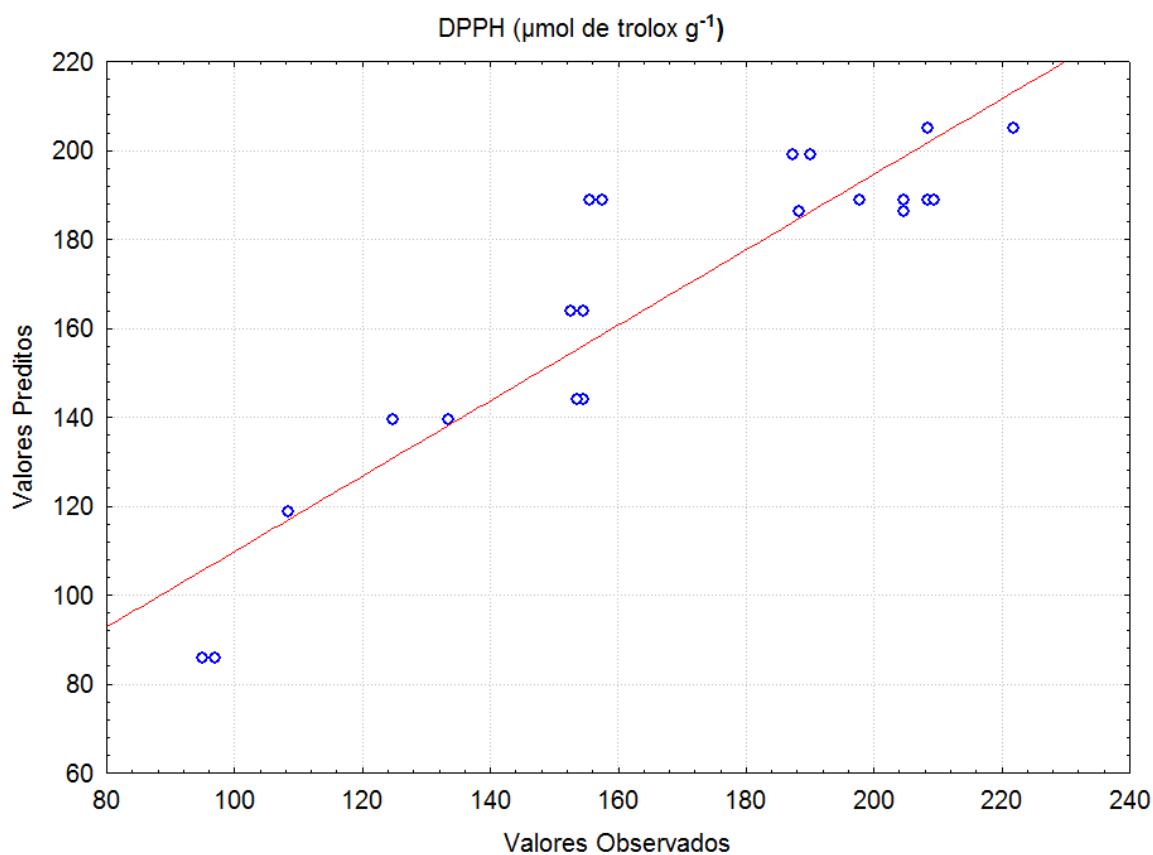
Deste modo pode-se visualizar que as variáveis concentração do solvente, tempo, temperatura e a interação entre concentração do solvente e tempo foram significativas para o método de sequestro de radical DPPH•. A partir do Gráfico 4 pode-se avaliar a interação entre as variáveis concentração do solvente e tempo.



**Gráfico 4 - Meios preditos para a resposta sequestro do radical DPPH.**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

Ao avaliar o Gráfico 4, verifica-se que o maior valor foi de 193,61  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$  obtido para a interação entre as variáveis, e foi obtida com o tempo em seu nível inferior (-1) e a concentração do solvente em seu nível superior (+1), aonde os valores entre parenteses são os intervalos de confiança a 95%. Partindo no nível inferior, ao aumentarmos a variável concentração do solvente e tempo, percebe-se que há um aumento das respostas.

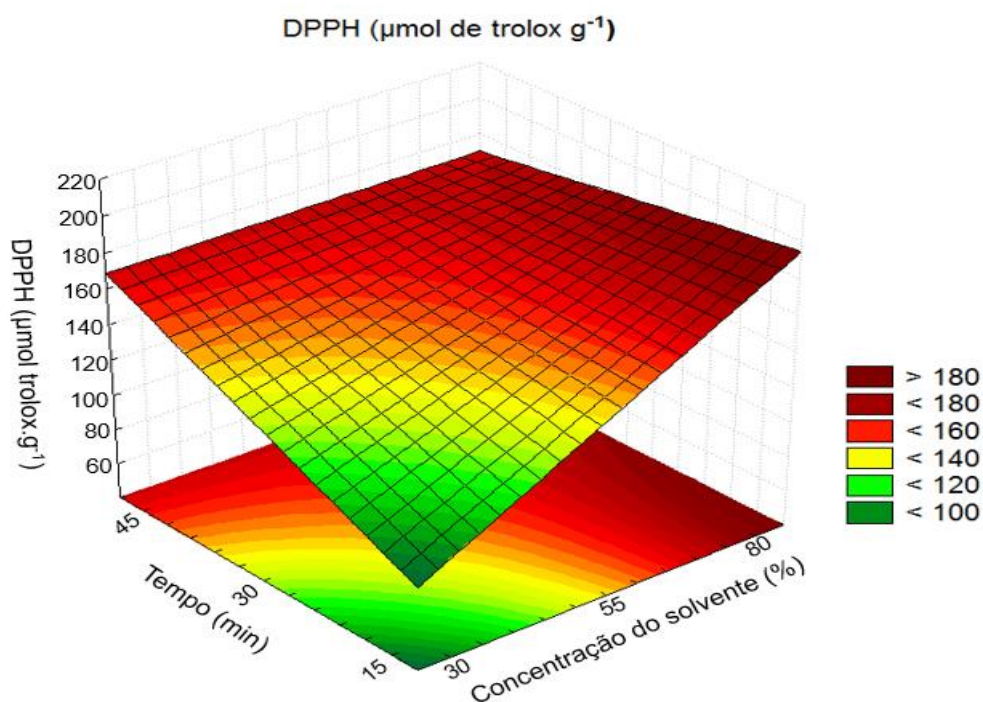
Outra forma de visualizar a confiabilidade do modelo estatístico proposto é através da Reta de Igualdade (Gráfico 5), que relaciona os valores observados com os valores preditos pelo modelo. Quanto menor for a dispersão dos valores observados em relação à reta que representa os valores preditos, melhor e mais ajustado é considerado o modelo estatístico (OLIVEIRA; ANDOLFATTO, 2014).



**Gráfico 5 - Valores observados x preditos para o método de sequestro do radical DPPH•**  
Fonte: Dados da Pesquisa(2016).

Por meio da análise do Gráfico 5, pode-se afirmar que houve pouca dispersão dos valores observados em relação a reta de valores preditos, confirmando assim o bom ajuste do modelo para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.

O Gráfico de Superfície de Resposta (Gráfico 6) avalia a influência das variáveis independentes em relação a resposta desejada.



**Gráfico 6 - Gráfico de superfície de resposta para o método de sequestro do radical DPPH.**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

Ao analisar o Gráfico 6 é possível visualizar uma região de vermelho mais intenso que indica que a maior resposta foi obtida no nível superior (+1) de concentração do solvente (80:20 etanol:água (v/v), e no nível inferior (-1) da variável tempo que corresponde a 15 minutos de contato entre o solvente e o extrato.

É possível descrever o modelo obtido a partir do tratamento estatístico dos dados por meio de uma equação matemática gerada pelos efeitos significativos e os valores codificados das variáveis. A Tabela 5 apresenta os coeficientes de regressão para a avaliação da atividade antioxidante para o método de sequestro do radical DPPH.

**Tabela 5 - Coeficientes de regressão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•**

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t <sub>calc</sub>	p-valor	Limite de confiança (-) 95%	Limite de confiança (+) 95%
Modelo	155,2160	4,803008	32,31642	0,000000	144,9146	165,5174
Curvatura	33,6892	9,197060	3,66304	0,002558	13,9634	53,4149
[EtOH] (%)	22,7164	4,803008	4,72961	0,000323	12,4149	33,0178
Temperatura (°C)	21,9953	4,803008	4,57947	0,000429	11,6938	32,2967
Tempo (min)	11,8990	4,803008	2,47741	0,026602	1,5976	22,2004
[EtOH] x Temperatura	2,0434	4,803008	0,42544	0,676986	-8,2581	12,3448
[EtOH] x Tempo	-18,3894	4,803008	-3,82872	0,001843	-28,6908	-8,0879
Temperatura x Tempo	3,4858	4,803008	0,72574	0,479953	-6,8157	13,7872

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

No caso da curvatura ter sido significativa, implica na necessidade de adicionar mais pontos, com termos quadráticos. A equação (1) descrita abaixo é composta pelo coeficiente linear do modelo seguido pelos coeficientes das variáveis que foram significativas na resposta: concentração do solvente ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ), tempo ( $X_3$ ) e a interação entre concentração do solvente e tempo ( $X_5$ ).

$$\text{DPPH } (\mu\text{mol de trolox g}^{-1}) = 155,21 + 22,71 X_1 + 21,99 X_2 + 11,89 X_3 - 18,34 X_5 \quad (1)$$

Os coeficientes das variáveis individuais apresentam valores positivos, indicando que as melhores respostas são obtidas ao aumentar os níveis das variáveis.

A Tabela 6 apresenta de forma reduzida a tabela da ANOVA para o avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.

**Tabela 6 - Tabela ANOVA para o método de sequestro do radical DPPH•**

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	F <sub>calc</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>
Modelo	28887,05	7	4126,72091	11,18043	2,76	4,05088	0,8442
Resíduo	5167,43	14	369,102168				
Total	34054,48	21					

SQ – Soma dos Quadrados; GL – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio

Fonte: Dados da Pesquisa (2016)

Analisando os resultados obtidos na Tabela 6, percebe-se que para o Teste F, o valor de F calculado foi 4,05 vezes maior do que o valor de F tabelado para  $p < 0,05$  e o coeficiente de correlação do modelo foi de  $R^2 = 0,8482$ , indicando que o modelo foi predito e adequado.



#### 4.4 RESULTADOS PARA O MÉTODO DE REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS<sup>•+</sup>

Análogo ao procedimento de avaliação anterior, foram efetuadas as leituras no espectrofotômetro e coletado as absorvâncias da curva padrão (trolox) e dos extratos, ambos em triplicata e plotado um Gráfico de Calibração (Gráfico 7), permitindo o cálculo das concentrações através da equação da reta que representa o modelo.

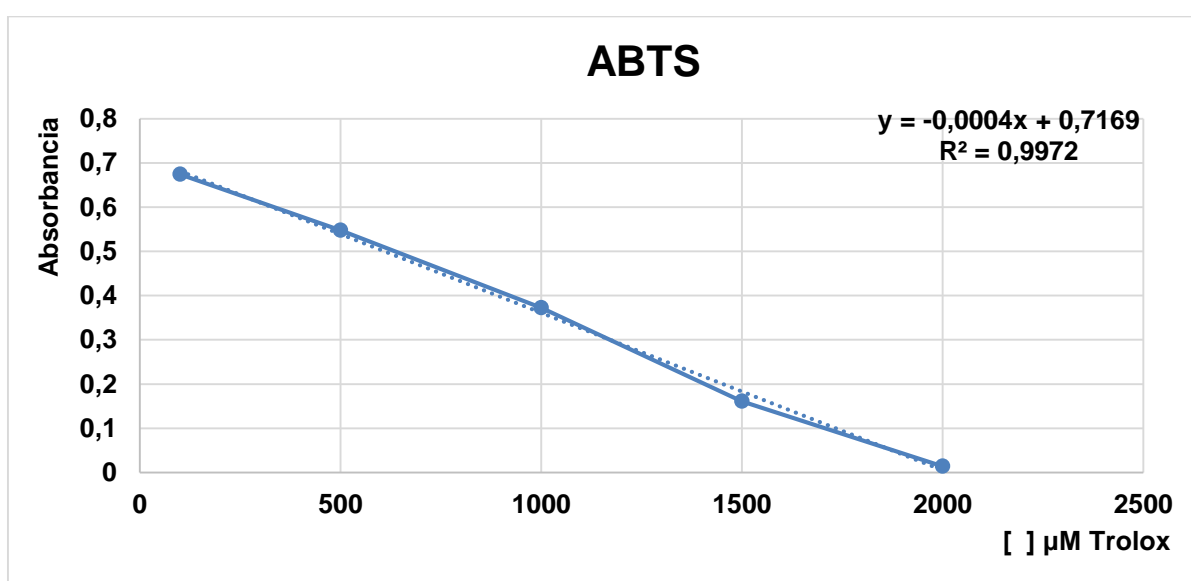


Gráfico 7 - Gráfico de calibração para o método de sequestro do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>  
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A tabela 7 apresenta os resultados para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>.

**Tabela 7 – Resultados para o método de avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>**

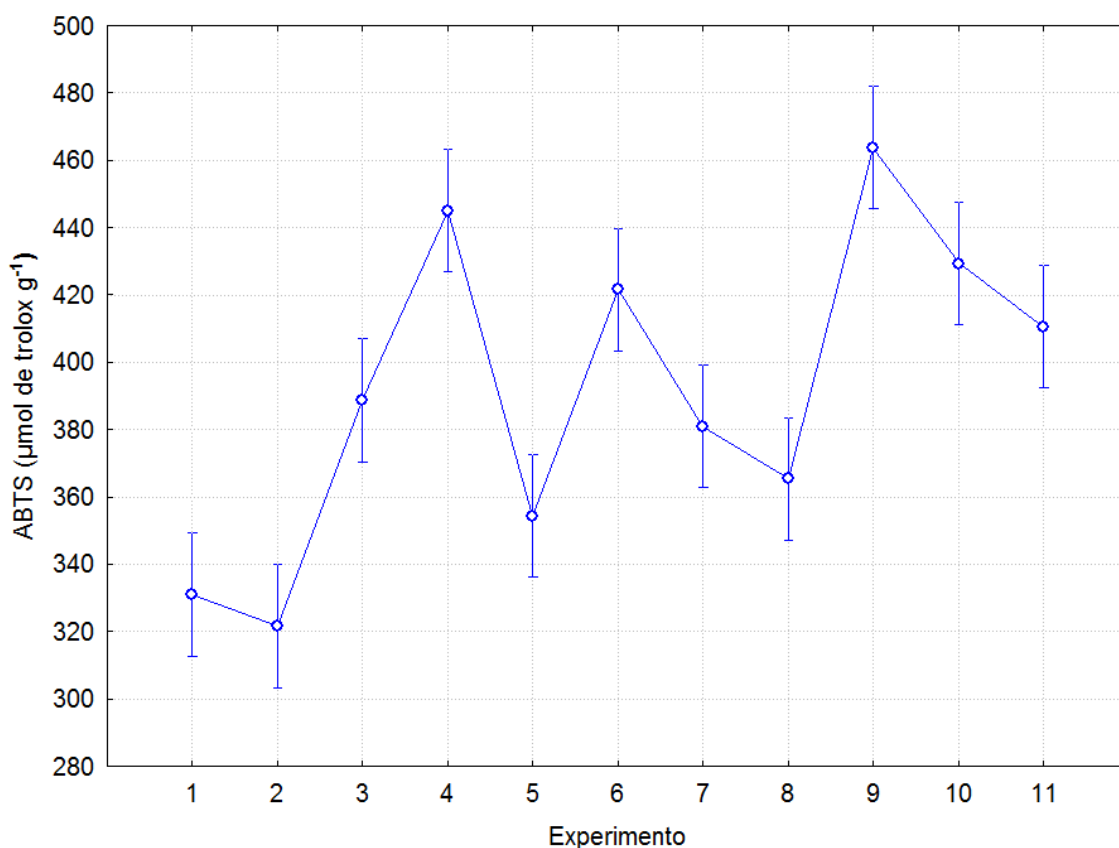
Experimento	ABTS ( $\mu\text{mol de trolox g}^{-1}$ )
1	330,93 $\pm$ 8,83 <sup>g</sup>
2	321,56 $\pm$ 4,41 <sup>g</sup>
3	388,75 $\pm$ 15,46 <sup>cdef</sup>
4	445,00 $\pm$ 6,62 <sup>ab</sup>
5	354,37 $\pm$ 11,04 <sup>fg</sup>
6	421,56 $\pm$ 26,51 <sup>abcd</sup>
7	380,93 $\pm$ 13,25 <sup>def</sup>
8	365,31 $\pm$ 0,00 <sup>efg</sup>
9	<b>463,75 <math>\pm</math> 11,04<sup>a</sup></b>
10	429,37 $\pm$ 2,20 <sup>ab</sup>
11	410,37 $\pm$ 2,20 <sup>bcde</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

Os resultados obtidos para o sequestro do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, apresentaram valores entre 321,56 à 463,75  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ . Em comparação a outros estudos que testaram o sequestro do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> nos mesmos moldes de análise, Bergamaschi (2010) encontrou em talos de beterraba 121,48  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$  e em cascas de maracujá 23,21  $\mu\text{mol de trolox por grama de amostra}$ , enquanto a *Moringa oleifera* apresentou valores máximos de 463,75  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ . Extratos de *Moringa oleifera* demonstram que o processo de extração foi eficiente e que a matriz de estudo tem um alto poder antioxidante em comparação a outras amostras vegetais.

Os resultados foram submetidos ao teste de Tukey, a fim de investigar se os experimentos diferem estatisticamente entre si ou não. A tabela 7 mostra o experimento 9 que diz respeito ao ponto central das variáveis independentes foi o que apresentou o maior resposta. Estatisticamente através do teste de Tukey, pode se verificar que os experimentos 4, 6, 9 e 10, não apresentam diferença significativa entre si.

Para melhor visualização dos resultados, o Gráfico 8 apresenta o teste de Tukey para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>.



**Gráfico 8 - Teste de Tukey para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS•<sup>+</sup>**

Fonte: Dados da Pesquisa (2016)

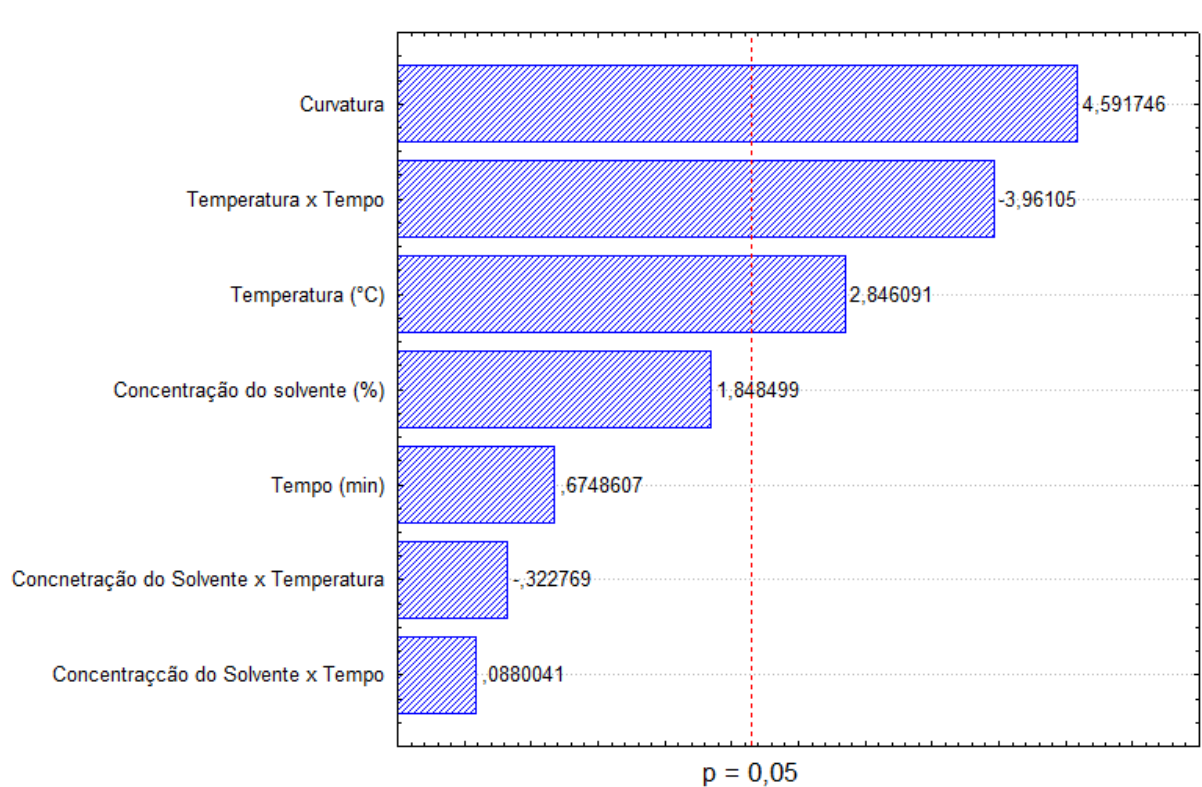
A tabela 8 apresenta os valores do efeito da curvatura e das variáveis independentes e suas interações para o sequestro do cátion radical ABTS•<sup>+</sup>.

**Tabela 8 - Estimativa dos efeitos para o método de sequestro do cátion radical ABTS•<sup>+</sup>**

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t <sub>calc</sub>	p-valor	Limite de confiança (-) 95%	Limite de confiança (+) 95%
Modelo	376,0551	6,65665	56,49313	0,000000	361,7780	390,3322
Curvatura	117,0575	25,49303	4,59175	0,000419	62,3804	171,7347
[EtOH] (%)	24,6096	13,31330	1,84850	0,085760	-3,9446	53,1638
Temperatura (°C)	37,8909	13,31330	2,84609	0,012949	9,3367	66,4451
Tempo (min)	8,9846	13,31330	0,67486	0,510756	-19,5696	37,5388
[EtOH] x Temperatura	-4,2971	13,31330	-0,32277	0,751640	-32,8513	24,2571
[EtOH] x Tempo	1,1716	13,31330	0,08800	0,931120	-27,3826	29,7258
Temperatura x Tempo	-52,7346	13,31330	-3,96105	0,001421	-81,2888	-24,1804

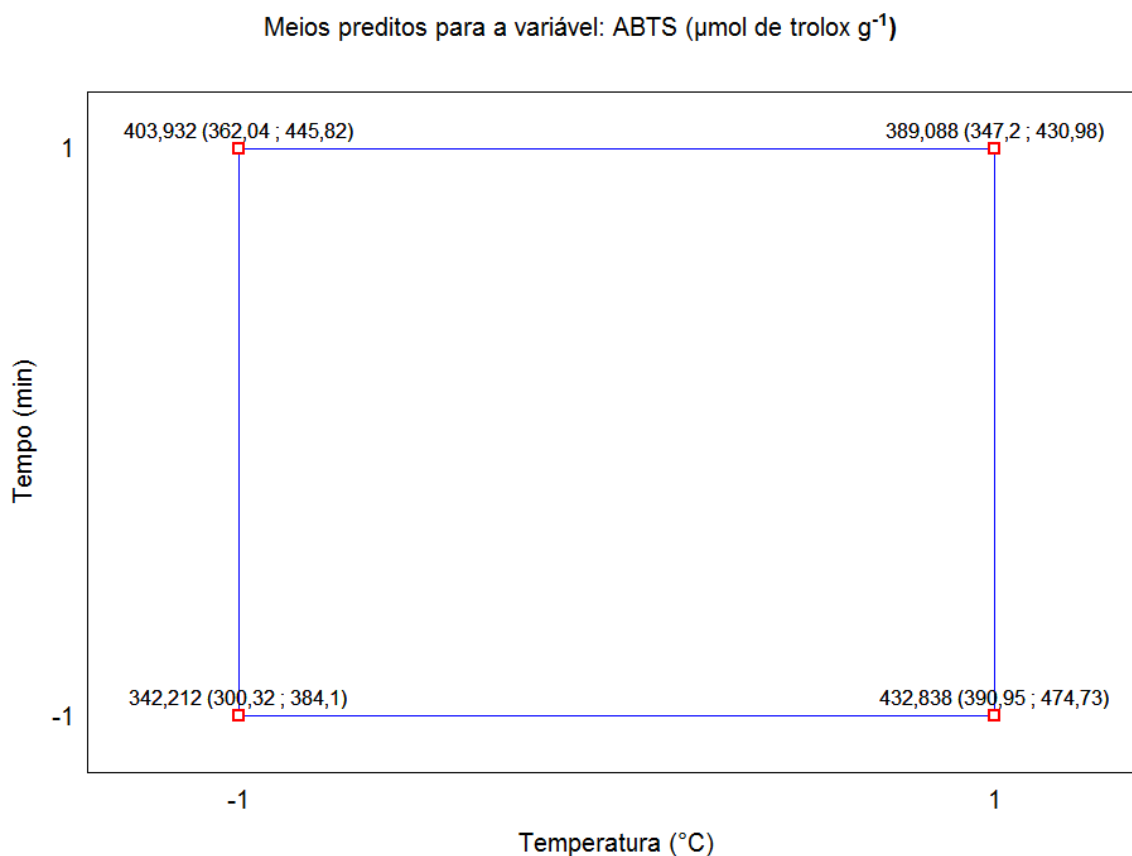
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A análise da Tabela 8 permite identificar os fatores significativos em vermelho. Portanto, para o método de sequestro do cátion radical  $ABTS^{\bullet+}$ , o modelo experimental, a curvatura, a variável temperatura e a interação entre temperatura e tempo foram estatisticamente significativas no trabalho, afinal apresentaram o p-valor menor ou igual a 0,05. O Gráfico de Pareto (Gráfico 9) demonstra visualmente tal afirmação.



**Gráfico 9 - Gráfico de Pareto para o método de sequestro do cátion radical  $ABTS^{\bullet+}$**   
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

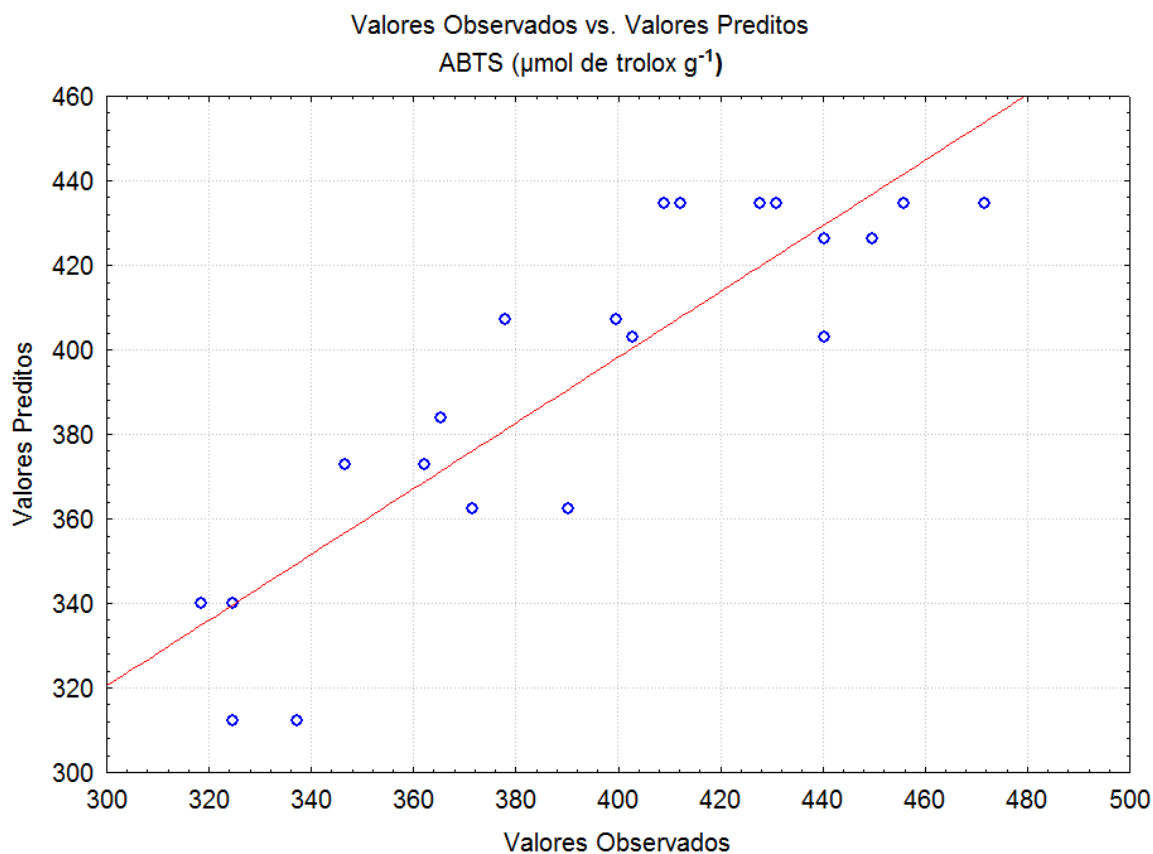
A partir do Gráfico 10 pode-se avaliar a interação entre as variáveis tempo e temperatura.



**Gráfico 10 - Meios preditos para a resposta sequestro do cátion radical ABTS•<sup>+</sup>**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

Há um aumento significativo na resposta quando passamos do nível inferior (-1) do tempo e temperatura, para o nível superior (+1) da temperatura. Quando as respostas são avaliadas a partir dos níveis superiores (+1) do tempo e temperatura, a resposta aumenta quando passamos para um nível inferior (-1) da temperatura. Assim demonstrando que a respostas são dependentes da interação entre as variáveis.

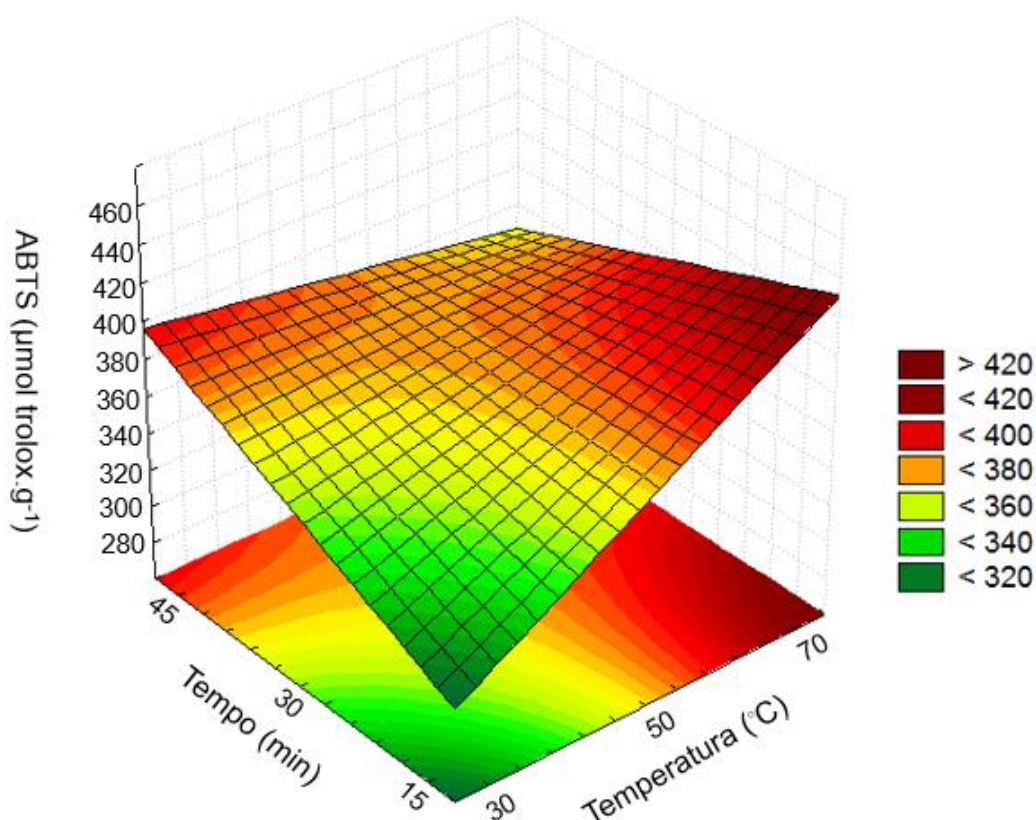
O Gráfico 11 apresenta os valores preditos e os valores observados para o método de sequestro do cátion radical ABTS•<sup>+</sup>.



**Gráfico 11 - Valores observados x preditos para o método de sequestro do cátion radical ABTS $\cdot^+$**   
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

O Gráfico 11 mostra que houve alguma dispersão dos pontos dos valores observados em torno da reta dos valores preditos, porém não significativamente para que o modelo matemático não seja considerado com bom ajuste.

O Gráfico de Superfície de Resposta (Gráfico 12) avalia a influência das variáveis independentes em relação à resposta desejada para o método do sequestro do cátion radical ABTS $\cdot^+$ .



**Gráfico 12 - Gráfico de superfície de resposta para o método de sequestro do cátion radical ABTS•+**

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A região de vermelho mais intenso representa a maior resposta foi obtida no nível superior (+1) da temperatura ( $70^{\circ}\text{C}$ ) e nível inferior (-1) do tempo que corresponde a 15 minutos de contato entre o solvente e a amostra.

A Tabela 9 apresenta os coeficientes de regressão para a avaliação da atividade antioxidante para o método de sequestro do cátion radical ABTS•+, a fim de descrever o modelo obtido a partir do tratamento estatístico.

**Tabela 9 - Coeficientes de regressão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS•+**

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	T <sub>calc</sub>	p-valor	Limite de confiança (-) 95%	Limite de confiança (+) 95%
Modelo	376,0551	6,65665	56,49313	0,000000	361,7780	390,3322
Curvatura	58,5288	12,74652	4,59175	0,000419	31,1902	85,8673
[EtOH] (%)	12,3048	6,65665	1,84850	0,085760	-1,9723	26,5819
Temperatura (°C)	18,9454	6,65665	2,84609	0,012949	4,6683	33,2225
Tempo (min)	4,4923	6,65665	0,67486	0,510756	-9,7848	18,7694
[EtOH] x Temperatura	-2,1486	6,65665	-0,32277	0,751640	-16,4257	12,1285
[EtOH] x Tempo	0,5858	6,65665	0,08800	0,931120	-13,6913	14,8629
Temperatura x Tempo	-26,3673	6,65665	-3,96105	0,001421	-40,6444	-12,0902

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

No caso da curvatura ter sido significativa, implica na necessidade adicionar mais pontos, com termos quadráticos. A equação (2) descrita abaixo é composta pelo coeficiente linear do modelo seguido pelos coeficientes das variáveis que foram significativas na resposta: temperatura ( $X_2$ ), e a interação entre temperatura e tempo ( $X_6$ ).

$$\text{ABTS } (\mu\text{mol de trolox g}^{-1}) = 376,05 + 18,94 X_2 - 26,36 X_6 \quad (2)$$

O coeficiente da variável temperatura apresenta valor positivo, indicando que há uma melhora na resposta ao aumentar a temperatura. A Tabela 10 apresenta de forma reduzida a tabela da ANOVA para o avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do cátion radical ABTS•+.

**Tabela 10 - Tabela ANOVA para o método de sequestro do cátion radical ABTS•+.**

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	F <sub>calc</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>
Modelo	34639,56	7	4948,50911	6,979796	2,76	2,528912	0,777
Resíduo	9925,67	14	708,976167				
Total	44565,23	21					

SQ – Soma dos Quadrados; GL – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio

Fonte: Dados da Pesquisa (2016)

A tabela 10 mostra que o F calculado foi 2,52 vezes maior do que o valor de F tabelado para  $p < 0,05$  e o coeficiente de correlação do modelo foi de  $R^2 = 0,777$ , sendo considerado um bom modelo, levando em consideração a complexidade da extração de compostos bioativos de matrizes vegetais (OLIVEIRA; ANDOLFATTO, 2014).



#### 4.5 RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS – FOLIN-CIOCALTEAU

Para a quantificação do teor de fenólicos totais, foi plotado o Gráfico de Calibração (Gráfico 13) utilizando o ácido gálico como padrão, e através da equação da reta foi possível calcular as concentrações das amostras.

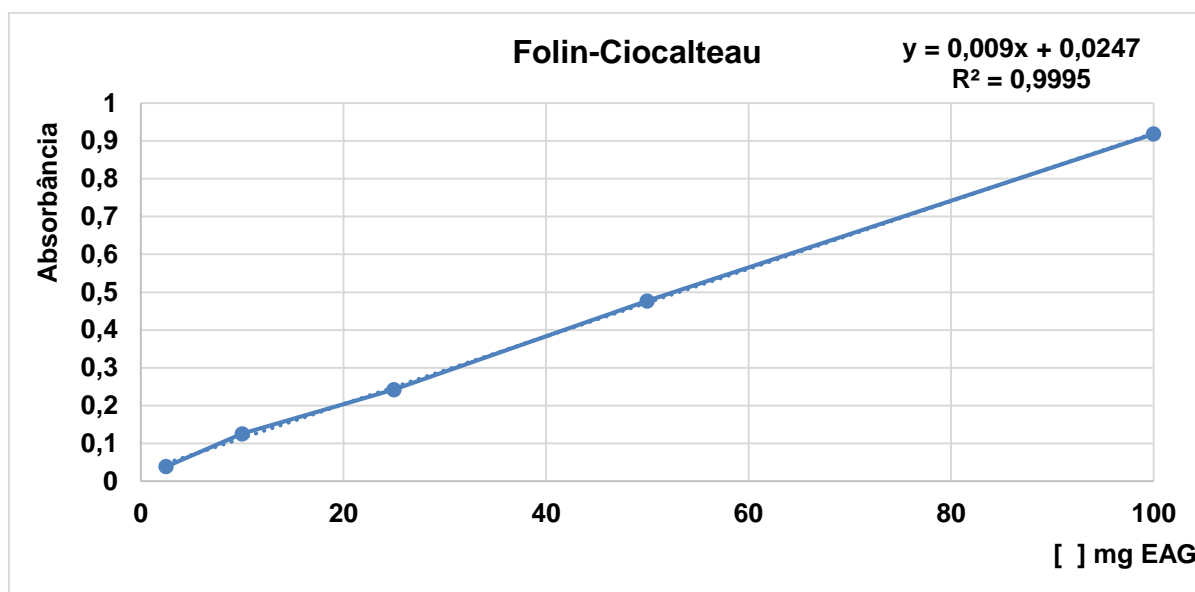


Gráfico 13 - Gráfico de calibração para quantificação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A tabela 11 apresenta os resultados para a determinação de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu.

Tabela 11 - Resultados para a determinação de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu

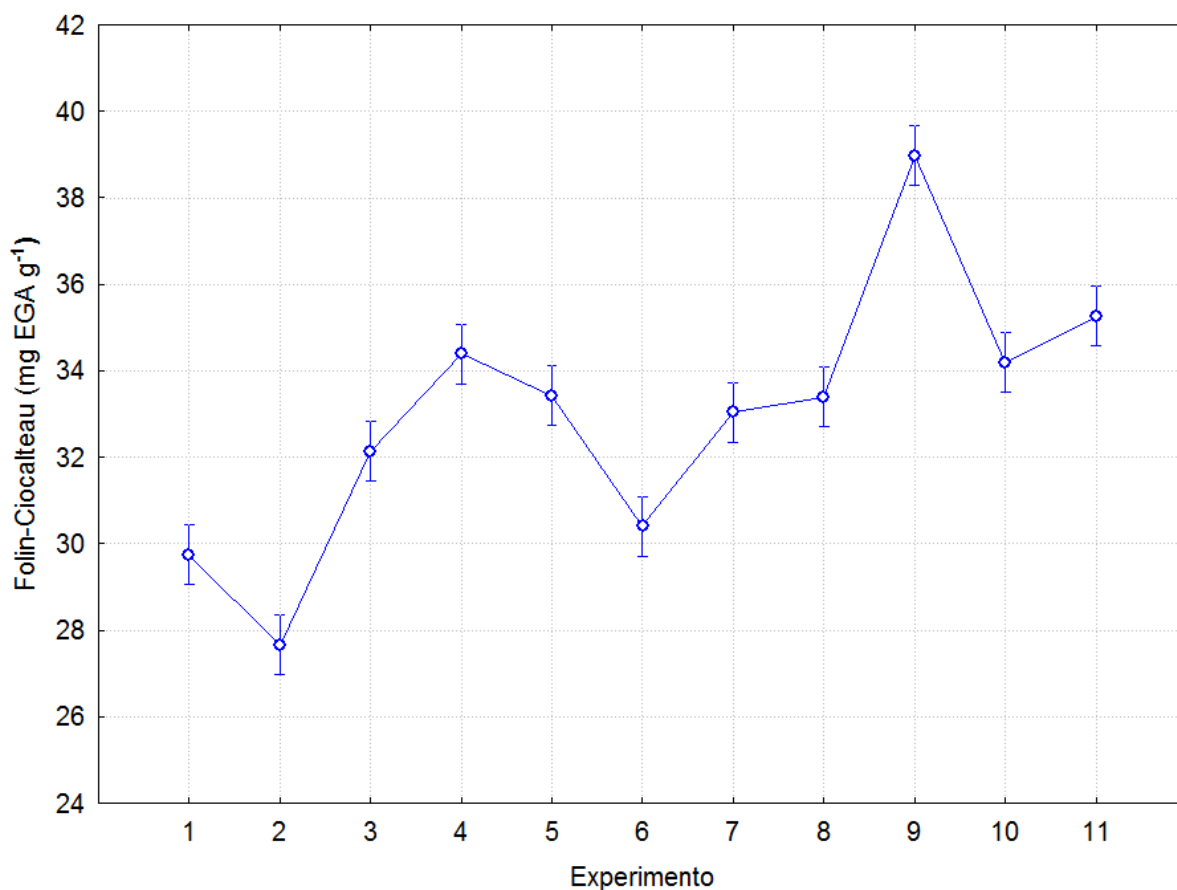
Experimento	Folin-Ciocalteu (mg EGA g <sup>-1</sup> )
1	29,74 ± 0,09 <sup>f</sup>
2	27,65 ± 0,68 <sup>g</sup>
3	32,13 ± 0,14 <sup>e</sup>
4	34,39 ± 0,39 <sup>bc</sup>
5	33,42 ± 0,04 <sup>bc</sup>
6	30,40 ± 0,54 <sup>ef</sup>
7	33,04 ± 0,24 <sup>cd</sup>
8	33,38 ± 0,44 <sup>cd</sup>
9	<b>38,97 ± 0,78<sup>a</sup></b>
10	34,18 ± 0,19 <sup>bc</sup>
11	35,26 ± 0,24 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

Os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais apresentaram valores entre 27,65 e 38,97 mg EAG.g<sup>-1</sup>. Em comparação com outros estudos, Rodríguez Pérez (2015), encontrou um máximo de 47±4 mg de (EAG g<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, a fim de investigar se os experimentos diferem estatisticamente entre si ou não. O experimento 9 (tabela 11) desenvolvido com o ponto central das variáveis independentes foi o que apresentou a maior resposta. Estatisticamente através do teste de Tukey, pode se verificar que os experimento 9 diferiu significativamente dos demais ensaios.

Para melhor visualização dos resultados, o Gráfico 14 apresenta o teste de Tukey para a determinação do teor de compostos fenólicos.



**Gráfico 14 - Teste de Tukey para a determinação do teor de compostos fenólicos – Folin-Ciocalteu**

**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

A análise do Gráfico 14 permite visualizar que o experimento 9 para um intervalo de confiança de 95% apresenta diferença em relação aos demais. A tabela

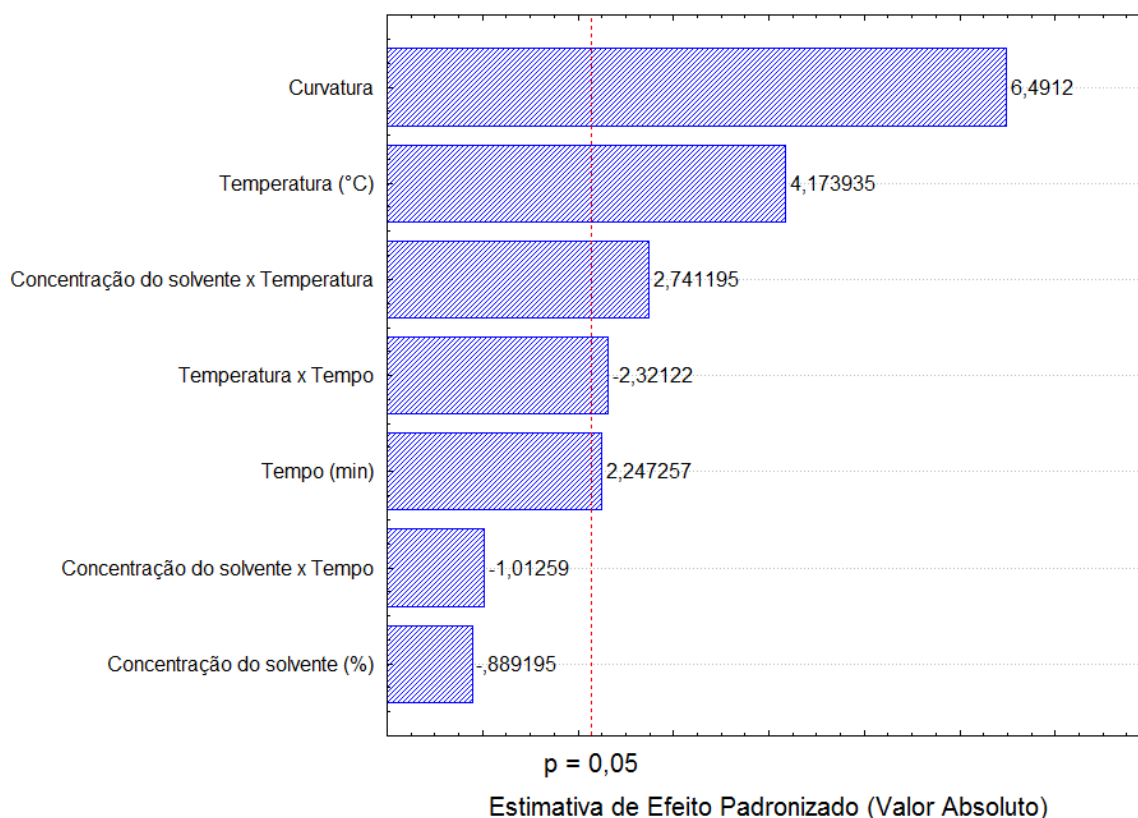
12 apresenta os valores do efeito da curvatura e das variáveis independentes e suas interações para a determinação do teor de compostos fenólicos.

**Tabela 12 - Estimativa dos efeitos para a determinação de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu**

Fatores	Efeito	Erro Padrão	$t_{\text{calc}}$	p-valor	Limite de confiança (-) 95%	Limite de confiança (+) 95%
Modelo	31,77381	0,351512	90,39187	0,000000	31,01989	32,52773
Curvatura	8,73838	1,346188	6,49120	0,000014	5,85109	11,62566
Concentração do solvente (%)	-0,62513	0,703024	-0,88919	0,388922	-2,13296	0,88271
Temperatura (°C)	2,93438	0,703024	4,17393	0,000937	1,42654	4,44221
Tempo (min)	1,57988	0,703024	2,24726	0,041267	0,07204	3,08771
[EtOH] x Temperatura	1,92713	0,703024	2,74120	0,015918	0,41929	3,43496
[EtOH] x Tempo	-0,71188	0,703024	-1,01259	0,328437	-2,21971	0,79596
Temperatura x Tempo	-1,63188	0,703024	-2,32122	0,035875	-3,13971	-0,12404

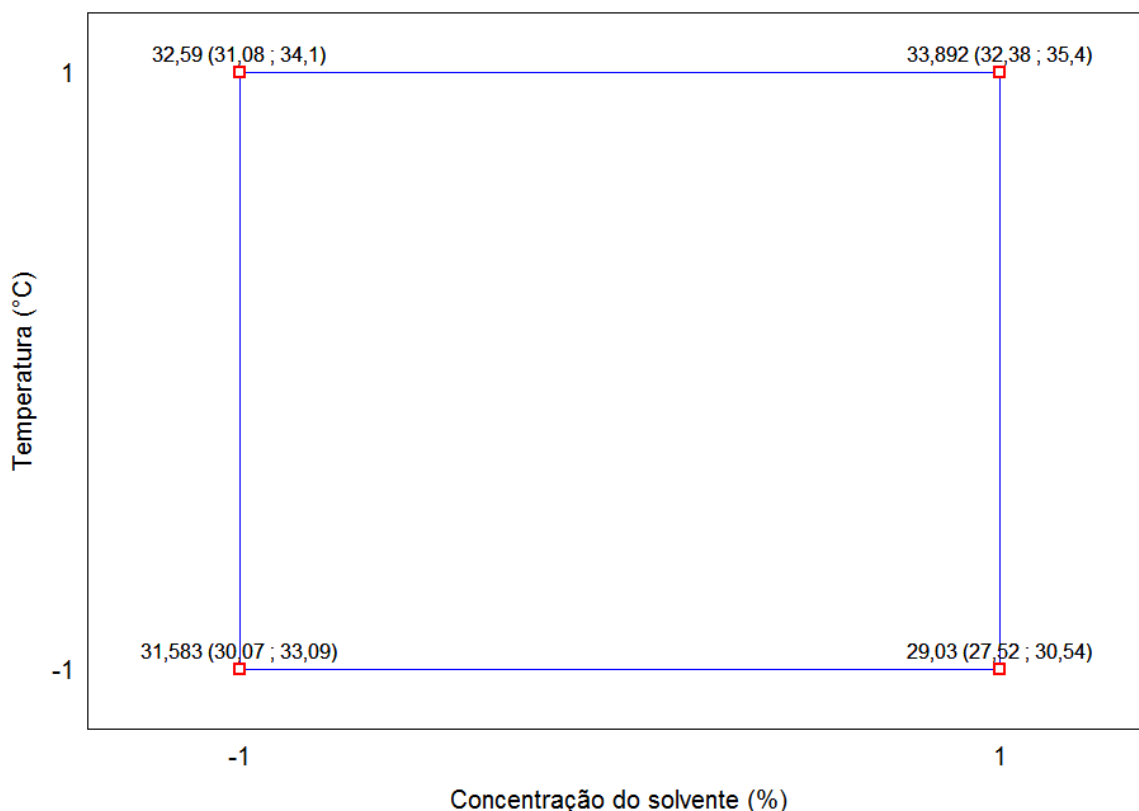
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

. Os fatores modelo, curvatura, temperatura, tempo, a interação entre concentração do solvente e temperatura e a interação entre temperatura e tempo apresentaram p-valor menor ou igual a 0,05 (Tabela 12). O Gráfico de Pareto (Gráfico 15) demonstra visualmente tal afirmação.



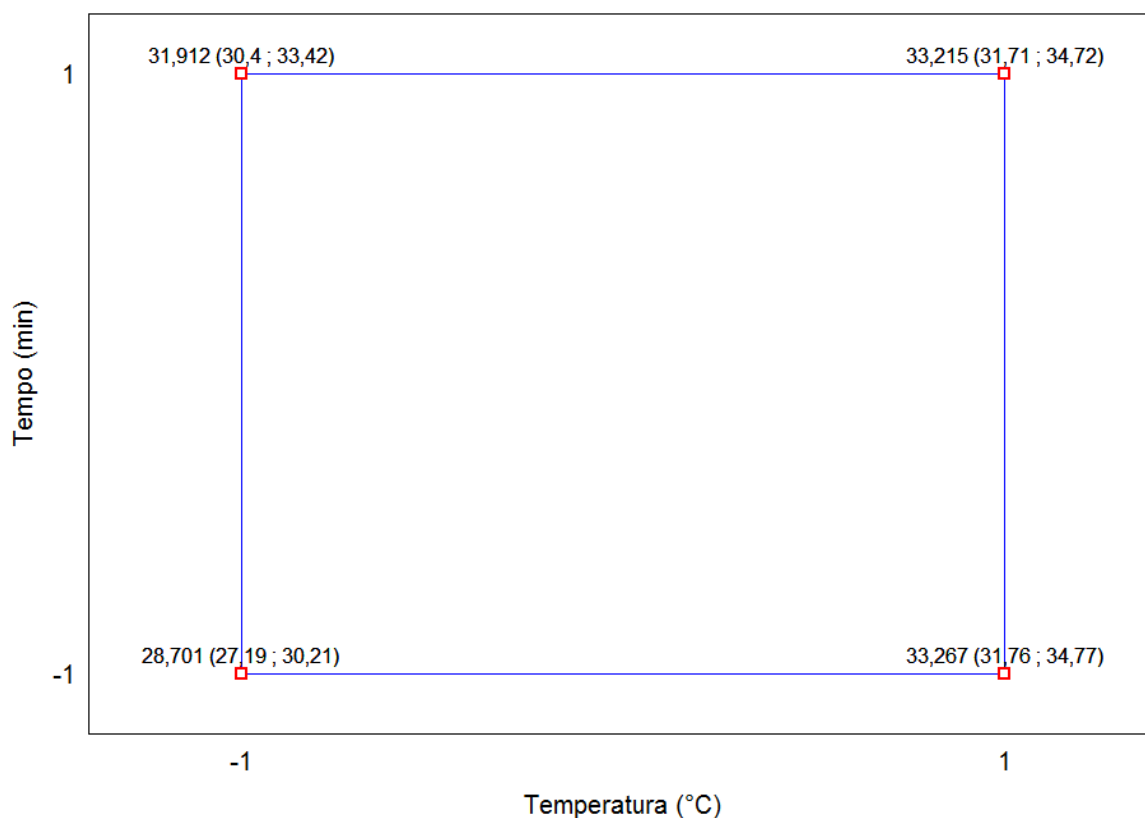
**Gráfico 15 - Gráfico de Pareto para a determinação de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu**  
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

Deste modo pode-se visualizar que as variáveis temperatura, tempo e interação entre concentração do solvente e temperatura e temperatura e tempo foram significativas ao atingir a linha para  $p < 0,05$  para a determinação do teor de compostos fenólicos. A partir do Gráfico 16 pode-se avaliar a interação entre as variáveis concentração do solvente e temperatura.



**Gráfico 16 - Meios preditos para a determinação do teor de compostos fenólicos**  
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

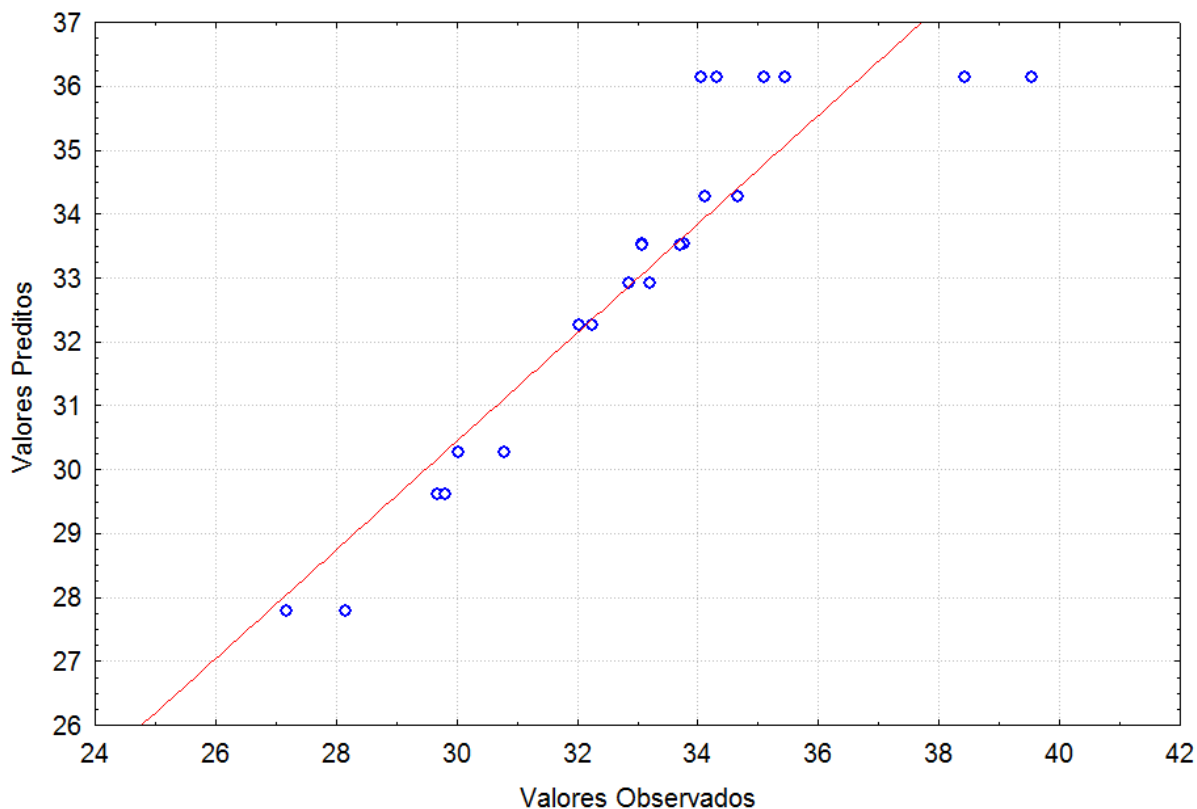
Entre as interações das variáveis citadas, a que apresenta maior resposta foi a partir dos níveis superiores (+1) da temperatura que representa 70°C e concentração do solvente que corresponde a 80% etanol 20% água. O Gráfico 17 apresenta a interação entre tempo e temperatura para a determinação do teor de compostos fenólicos.



**Gráfico 17 - Meios preditos para a determinação do teor de compostos fenólicos**  
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

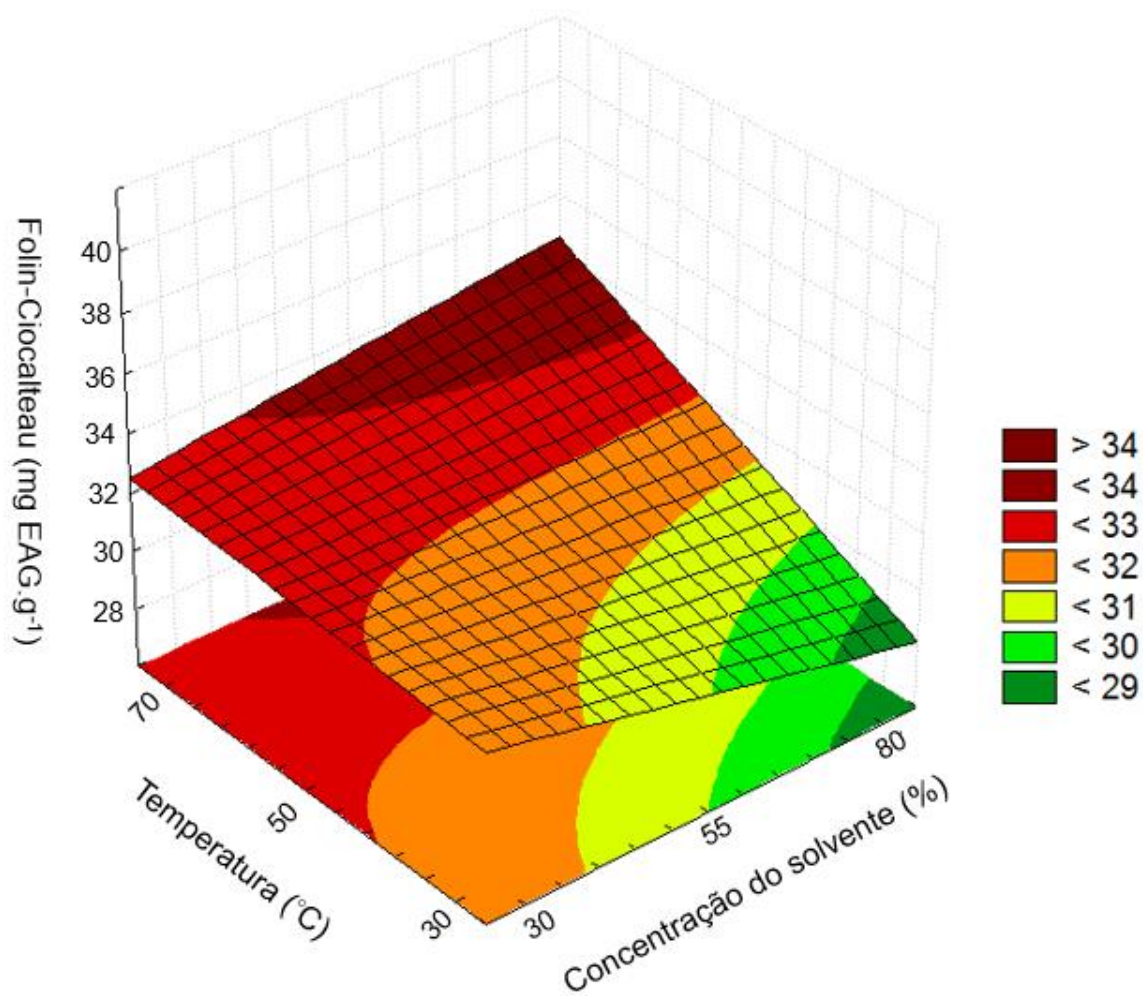
As maiores repostas foram obtidas com a temperatura em seu nível superior (+1) que corresponde a 70°C. Nessas condições de nível superior de temperatura, a variável tempo não apresentou mudança significativa. Porém quando se executa o experimento com a temperatura em seu nível inferior (-1) que corresponde a 30°C, a melhor resposta é obtida com a variável tempo em seu nível superior (+1) que representa 45 minutos de contato em solvente e extrato.

O Gráfico 18 apresenta os valores observados x valores preditos, para verificar a qualidade do ajuste do modelo matemático aos dados de determinação de fenólicos totais.



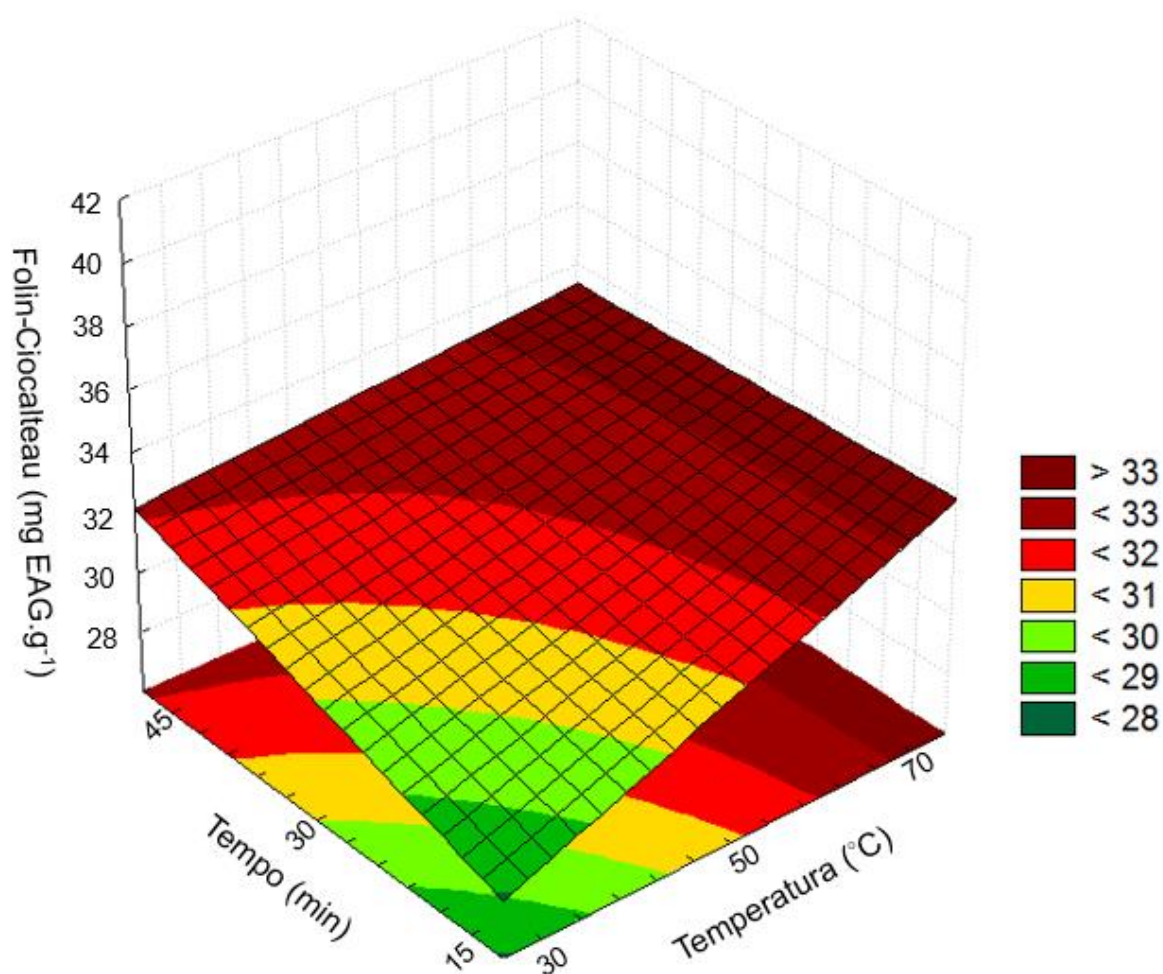
**Gráfico 18 - Valores observados x preditos para a determinação do teor de fenólicos totais - Folin-Ciocalteu**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

Através da análise do gráfico, pode-se afirmar que poucos pontos dos valores observados apresentaram dispersão em relação à reta de valores preditos, confirmando assim o bom ajuste do modelo para a determinação do teor de compostos fenólicos. Os Gráficos de Superfície de Resposta (Gráfico 19 e Gráfico 20) avaliam a influência das variáveis independentes em relação à resposta desejada. Na análise de determinação do teor de compostos fenólicos como resposta, foi utilizada a combinação das variáveis independentes concentração do solvente e temperatura e tempo e temperatura respectivamente.



**Gráfico 19 - Gráfico de superfície de resposta na determinação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

A região de vermelho mais intenso representa a maior resposta foi obtida no nível superior (+1) da temperatura (70°C) e nível superior (+1) da concentração do solvente que corresponde a 80% etanol e 20% água.



**Gráfico 20 - Gráfico de superfície de resposta na determinação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

As maiores respostas foram obtidas no nível superior (+1) da temperatura (70°C) e nesta condição o tempo de contato entre solvente e amostra não apresentou diferenças significativas. A Tabela 13 apresenta os coeficientes de regressão para a determinação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu, a fim de descrever o modelo obtido a partir do tratamento estatístico.



**Tabela 13 - Coeficientes de regressão para a determinação do teor de fenólicos totais – Folin-Ciocalteu**

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t <sub>calc</sub>	p-valor	Limite de confiança (-) 95%	Limite de confiança (+) 95%
Modelo	31,77381	0,351512	90,39187	0,000000	31,01989	32,52773
Curvatura	4,36919	0,673094	6,49120	0,000014	2,92554	5,81283
[EtOH] (%)	-0,31256	0,351512	-0,88919	0,388922	-1,06648	0,44136
Temperatura (°C)	1,46719	0,351512	4,17393	0,000937	0,71327	2,22111
Tempo (min)	0,78994	0,351512	2,24726	0,041267	0,03602	1,54386
[EtOH] x Temperatura	0,96356	0,351512	2,74120	0,015918	0,20964	1,71748
[EtOH] x Tempo	-0,35594	0,351512	-1,01259	0,328437	-1,10986	0,39798
Temperatura x Tempo	-0,81594	0,351512	-2,32122	0,035875	-1,56986	-0,06202

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

No caso da curvatura ter sido significativa, implica na necessidade adicionar mais pontos, com termos quadráticos. A equação (3) descrita abaixo é composta pelo coeficiente linear do modelo seguido pelos coeficientes das variáveis que foram significativas na resposta (linhas em vermelho): temperatura ( $X_2$ ), tempo ( $X_3$ ), a interação entre concentração do solvente e temperatura ( $X_4$ ) e a interação entre temperatura e tempo ( $X_6$ )

$$\text{Fenólicos totais (mg EAG g}^{-1}\text{)} = 31,77 + 1,46 X_2 + 0,78 X_3 + 0,96 X_4 - 0,81 X_6 \quad (3)$$

Os coeficientes das variáveis temperatura e tempo apresentam valores positivos, indicando que há uma melhora na resposta ao aumentá-los. A Tabela 14 apresenta de forma reduzida a tabela da ANOVA para a determinação do teor de compostos fenólicos.

**Tabela 14 - Tabela ANOVA para determinação do teor de compostos fenólicos**

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	F <sub>calc</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>
Modelo	156,82	7	22,4035265	11,33226	2,76	4,105891	0,849
Resíduo	27,68	14	1,97696911				
Total	184,50	21					

SQ – Soma dos Quadrados; GL – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A tabela 14 mostra que o F calculado foi 4,10 vezes maior do que o valor de F tabelado para  $p < 0,05$  e o coeficiente de correlação do modelo foi de  $R^2 = 0,849$  indicando que o modelo foi predito e adequado.

#### 4.6 RESULTADOS PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – FRAP

Análogo aos demais testes, foi plotado o Gráfico de Calibração para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP (Gráfico 21) a partir das leituras no espectrofotômetro das absorbâncias da curva, onde foi utilizado como padrão o sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ), sendo possível através da equação da reta calcular as concentrações das amostras.

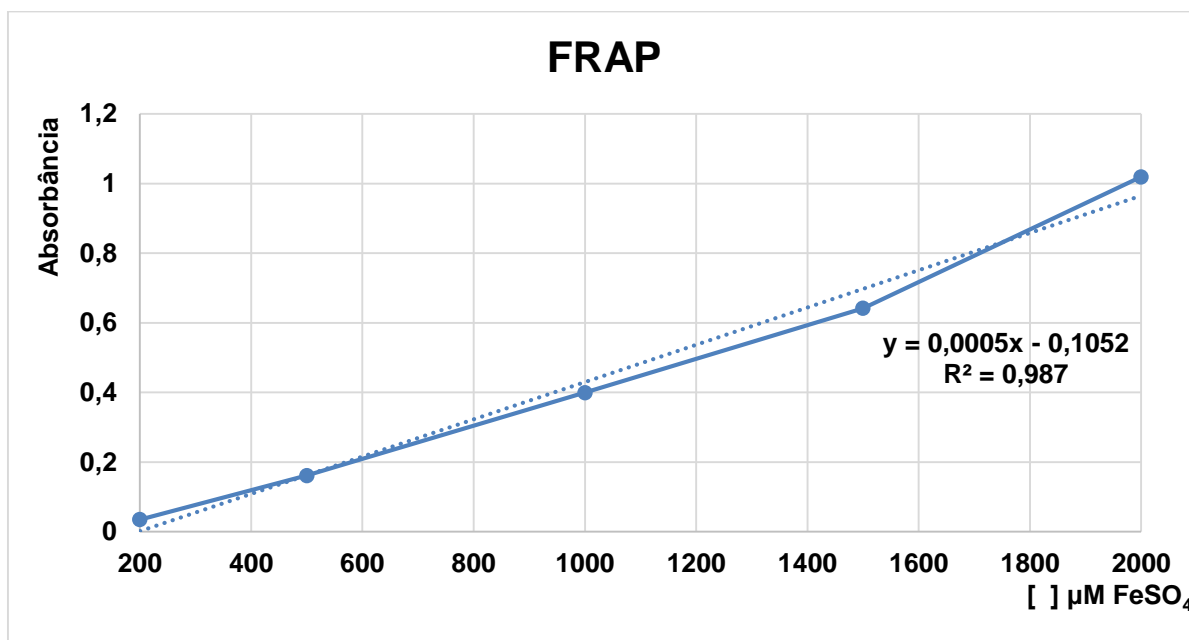


Gráfico 21 - Gráfico de calibração para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A Tabela 15 apresenta os resultados para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.

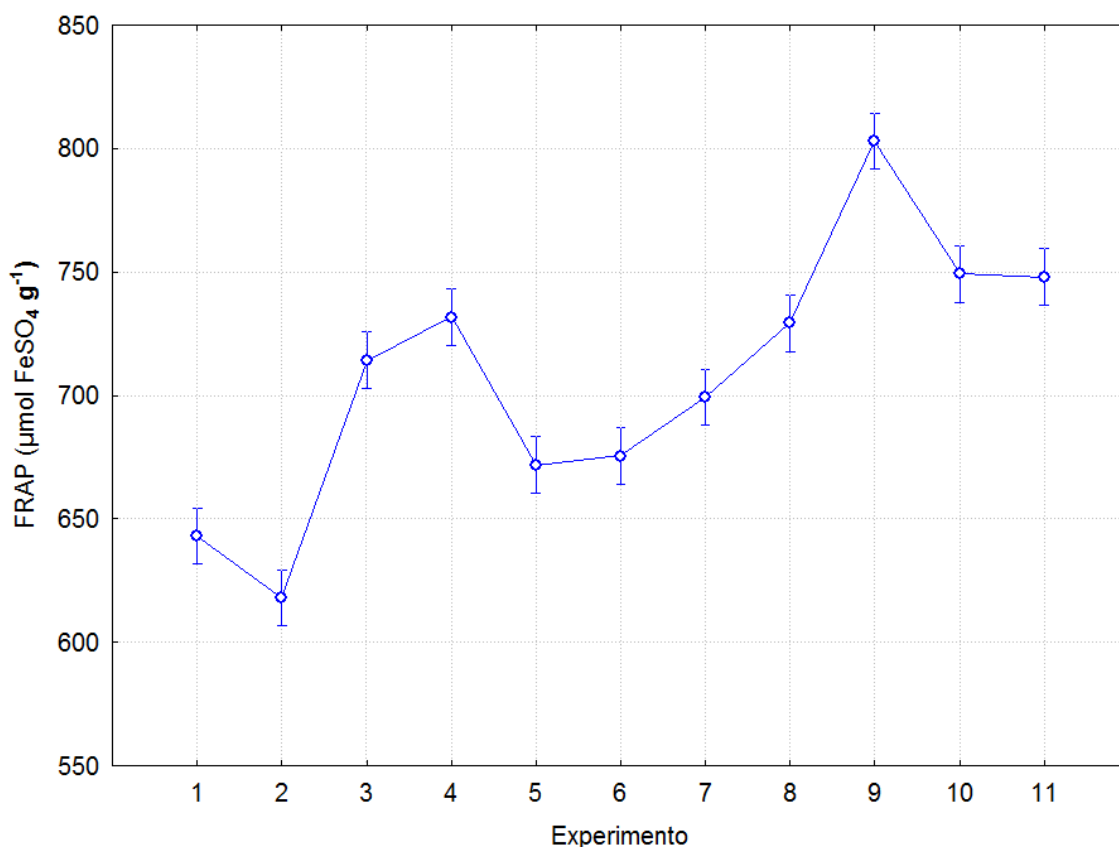
Tabela 15 - Resultados para a atividade antioxidante pelo método de FRAP

Experimento	FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ )
1	643,00 $\pm$ 0,00 <sup>fg</sup>
2	618,00 $\pm$ 7,07 <sup>g</sup>
3	714,25 $\pm$ 5,30 <sup>cd</sup>
4	731,75 $\pm$ 12,37 <sup>bc</sup>
5	671,75 $\pm$ 5,30 <sup>ef</sup>
6	675,50 $\pm$ 3,53 <sup>e</sup>
7	699,25 $\pm$ 5,30 <sup>de</sup>
8	729,25 $\pm$ 8,83 <sup>bc</sup>
9	<b>803,00 <math>\pm</math> 10,60<sup>a</sup></b>
10	749,25 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>
11	748,00 $\pm$ 7,07 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

Os resultados obtidos para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP, apresentaram valores entre 618,00 à 803,00  $\mu\text{mol de FeSO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ . Em comparação com outros estudos na avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP para as folhas da *Moringa oleifera*, Vongsak *et al* (2013), obteve em seu estudo o valor máximo de 515,50  $\mu\text{mol de FeSO}_4$  por grama de amostra, demonstrando que os valores encontrados são condizentes com a literatura e que o método apresenta uma boa sensibilidade (VONGSAK *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, a fim de investigar se os experimentos diferem estatisticamente entre si ou não. A tabela 15 mostra o experimento 9 que diz respeito ao ponto central das variáveis independentes foi o que apresentou o maior resposta. Estatisticamente através do teste de Tukey, pode se verificar que os experimento 9 apresentou a melhor resposta para este ensaio e diferiu significativamente dos demais (Gráfico 22).



**Gráfico 22 - Teste de Tukey para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

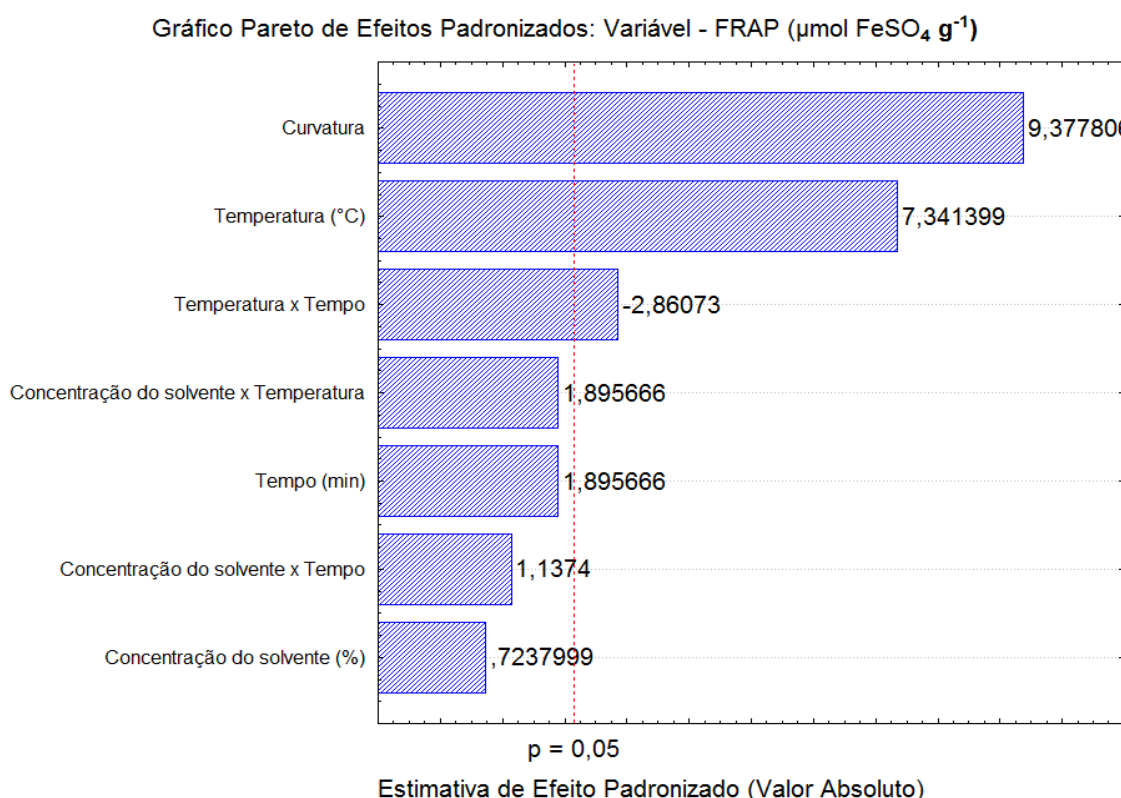
A tabela 16 apresenta os valores do efeito da curvatura e das variáveis independentes e suas interações para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.

**Tabela 16 - Estimativa dos efeitos para avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t <sub>calc</sub>	p-valor	Limite de confiança	
					(-) 95%	(+) 95%
Modelo	685,3438	4,53337	151,1777	0,000000	675,6206	695,0669
Curvatura	162,8125	17,36147	9,3778	0,000000	125,5758	200,0492
[EtOH] (%)	6,5625	9,06673	0,7238	0,481109	-12,8837	26,0087
Temperatura (°C)	66,5625	9,06673	7,3414	0,000004	47,1163	86,0087
Tempo (min)	17,1875	9,06673	1,8957	0,078838	-2,2587	36,6337
[EtOH] x Temperatura	17,1875	9,06673	1,8957	0,078838	-2,2587	36,6337
[EtOH] x Tempo	10,3125	9,06673	1,1374	0,274464	-9,1337	29,7587
Temperatura x Tempo	-25,9375	9,06673	-2,8607	0,012581	-45,3837	-6,4913

**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

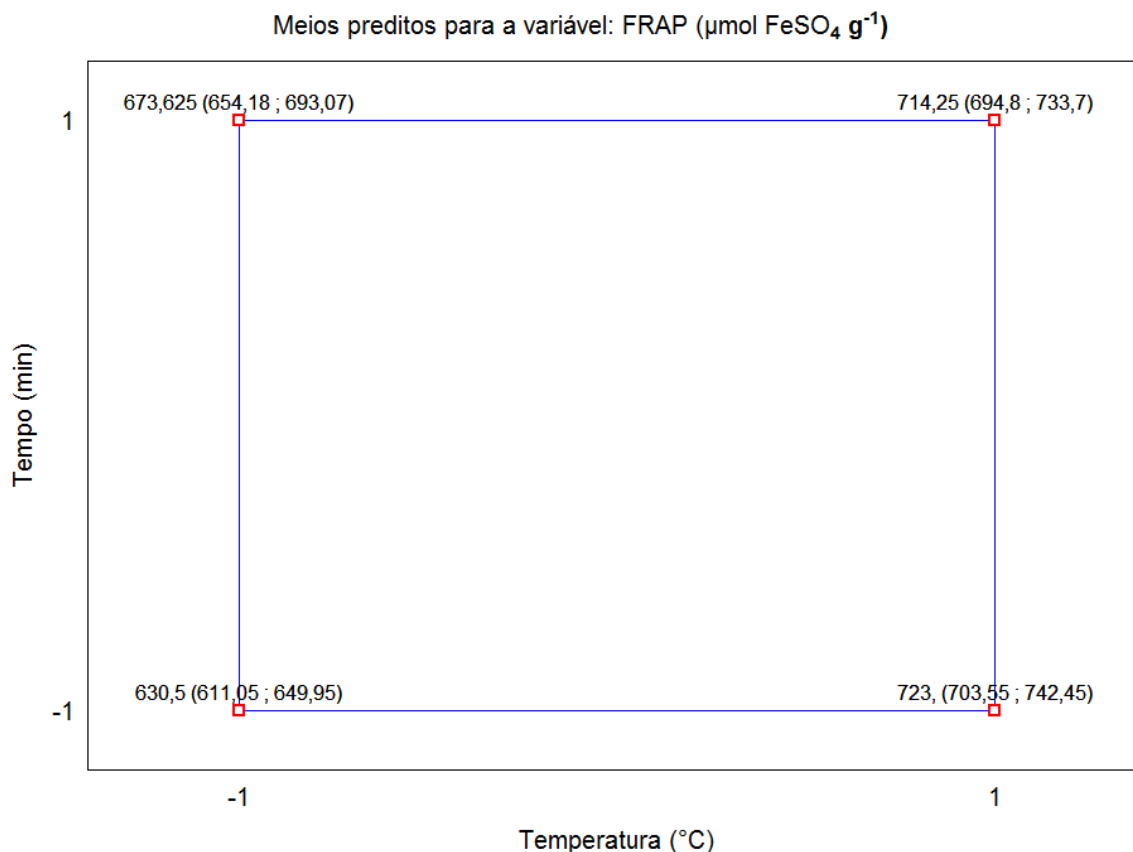
Através da análise dos efeitos para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP, pode-se observar que ha um nível de confiança de 95%, o modelo, a curvatura, a variável temperatura e a interação entre temperatura e tempo foram significativas para o estudo, apresentando valores de p-valor menor que 0,05 representados pelas linhas em vermelho. O Gráfico de Pareto (Gráfico 23) permite uma melhor visualização das variáveis significativas no processo de avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.



**Gráfico 23 - Gráfico de Pareto para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

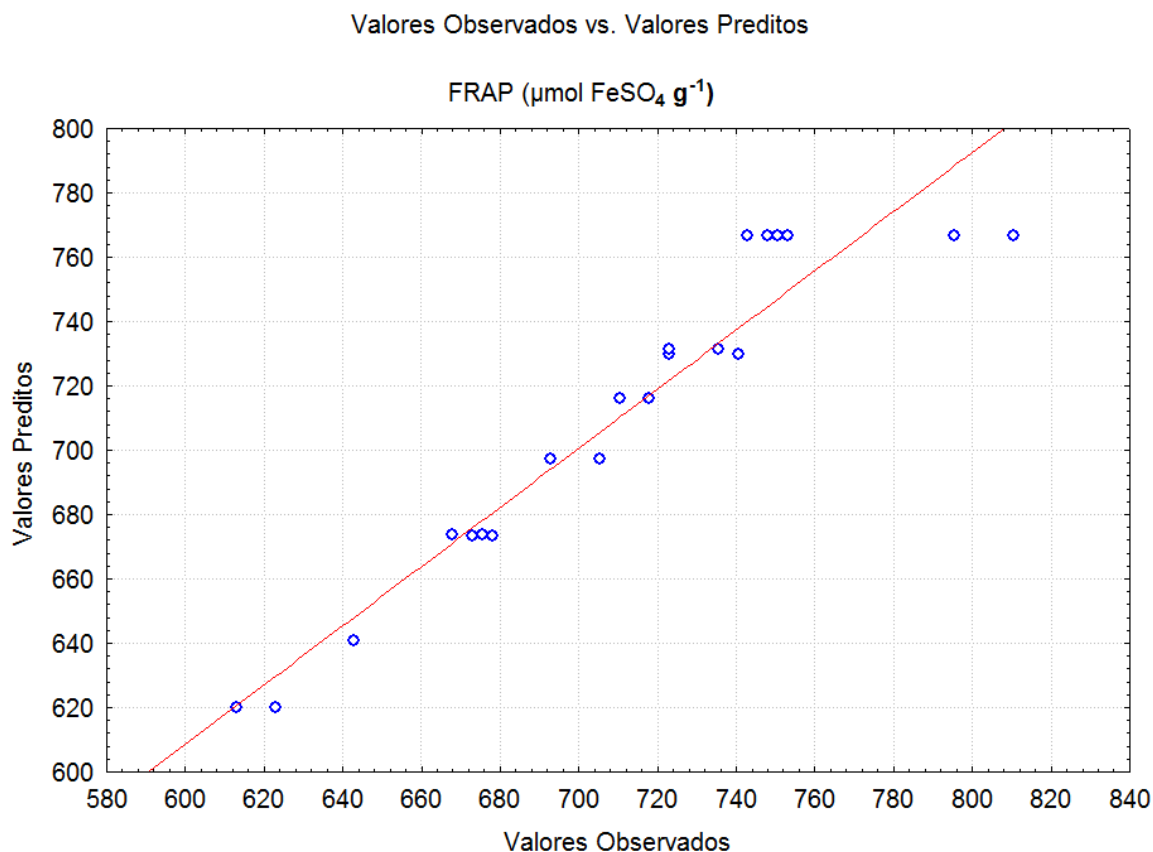
O efeito da variável temperatura apresentou valor positivo, indicando que nesta situação o aumento da temperatura, favorece e melhora a resposta. Tal afirmação tem embasamento na literatura, afinal termodinamicamente o aumento da temperatura tem influência direta e proporcional nas taxas de difusão e solubilidade dos analitos. Inversamente proporcional ao aumento da temperatura, a viscosidade e a tensão superficial diminuem. Tais mudanças proporcionam uma melhor interação entre analitos e solvente, e conseqüentemente uma melhora nas respostas (ERDOGAN *et al.*, 2011).

A partir do Gráfico 24 pode-se avaliar a interação entre as variáveis temperatura e tempo.



**Gráfico 24 - Meios preditos para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**  
Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

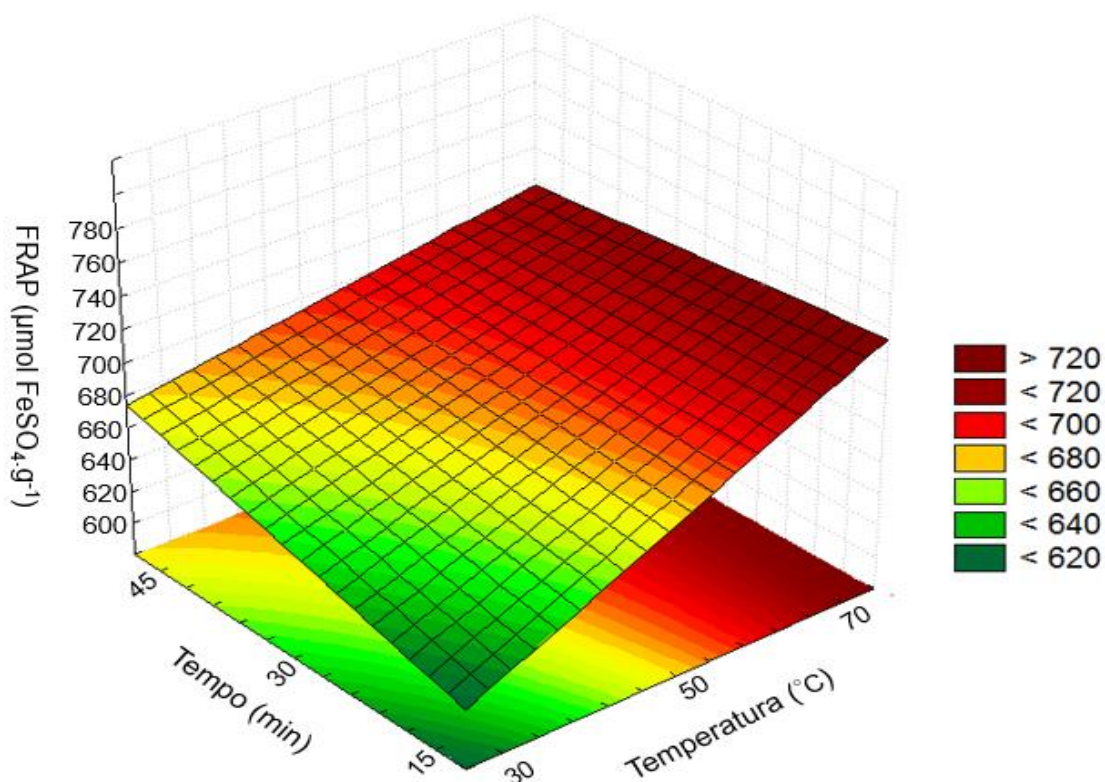
Há um aumento significativo na resposta quando passamos do nível inferior (-1) da variável temperatura, para o nível superior (+1), o que também ocorre com a variável tempo. Porém a melhor resposta é encontrada com a variável tempo em seu nível inferior e a temperatura em seu nível superior, assim demonstrando que a resposta é dependente da interação entre as variáveis. Para verificar a qualidade do ajuste do modelo matemático para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de FRAP, apresenta-se o Gráfico de valores observados x valores preditos (Gráfico 25).



**Gráfico 25 - Valores observados x preditos para avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

Observa-se que houve uma pequena dispersão dos pontos dos valores observados em relação à reta dos valores preditos, indicando que o modelo matemático proposto para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP apresenta boa confiabilidade.

A avaliação da influência das variáveis independentes tempo e temperatura em relação à resposta desejada da capacidade antioxidante pelo método de FRAP é demonstrada através do Gráfico de Superfície (Gráfico 26).



**Gráfico 26 - Gráfico de superfície de resposta na avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

A análise do gráfico permite concluir que a região em que a atividade antioxidante atingiu os valores máximos foi no nível superior (+1) da variável temperatura que corresponde a 70°C e com a variável tempo em seu nível inferior (-1) que corresponde a 15 minutos de contanto entre solvente e amostra.

A partir do tratamento estatístico dos dados é possível descrever o modelo obtido através de uma equação matemática, composta pelos coeficientes de regressão dos efeitos significativos e os valores codificados das variáveis. A Tabela 17 traz os coeficientes de regressão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.



**Tabela 17 - Coeficientes de regressão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t <sub>calc</sub>	p-valor	Limite de confiança (-) 95%	Limite de confiança (+) 95%
Modelo	685,3438	4,533366	151,1777	0,000000	675,6206	695,0669
Curvatura	81,4062	8,680735	9,3778	0,000000	62,7879	100,0246
[EtOH] (%)	3,2813	4,533366	0,7238	0,481109	-6,4419	13,0044
Temperatura (°C)	33,2813	4,533366	7,3414	0,000004	23,5581	43,0044
Tempo (min)	8,5937	4,533366	1,8957	0,078838	-1,1294	18,3169
[EtOH] x Temperatura	8,5938	4,533366	1,8957	0,078838	-1,1294	18,3169
[EtOH] x Tempo	5,1563	4,533366	1,1374	0,274464	-4,5669	14,8794
Temperatura x Tempo	-12,9688	4,533366	-2,8607	0,012581	-22,6919	-3,2456

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

No caso da curvatura ter sido significativa, implica na necessidade adicionar mais pontos, com termos quadráticos. A equação (4) demonstrada abaixo é composta pelo coeficiente linear do modelo e pelos coeficientes das variáveis significativas na resposta que estão em linhas vermelhas na tabela. Neste caso para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP, foi o coeficiente do modelo, da variável temperatura (X<sub>2</sub>) e da interação entre a variável temperatura e tempo (X<sub>6</sub>).

$$\text{FRAP } (\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}) = 685,34 + 33,28 X_2 - 12,96 X_6 \quad (4)$$

O coeficiente da variável temperatura apresenta valor positivo, indicando que há uma melhora na resposta ao aumenta-lo. A Tabela 18 apresenta de forma reduzida a tabela da ANOVA para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP.

**Tabela 18 - Tabela ANOVA para avaliação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP**

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	F <sub>calc</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>
Modelo	52291,94	7	7470,27699	22,71826	2,76	8,231255	0,919
Resíduo	4603,52	14	328,822545				
Total	56895,45	21					

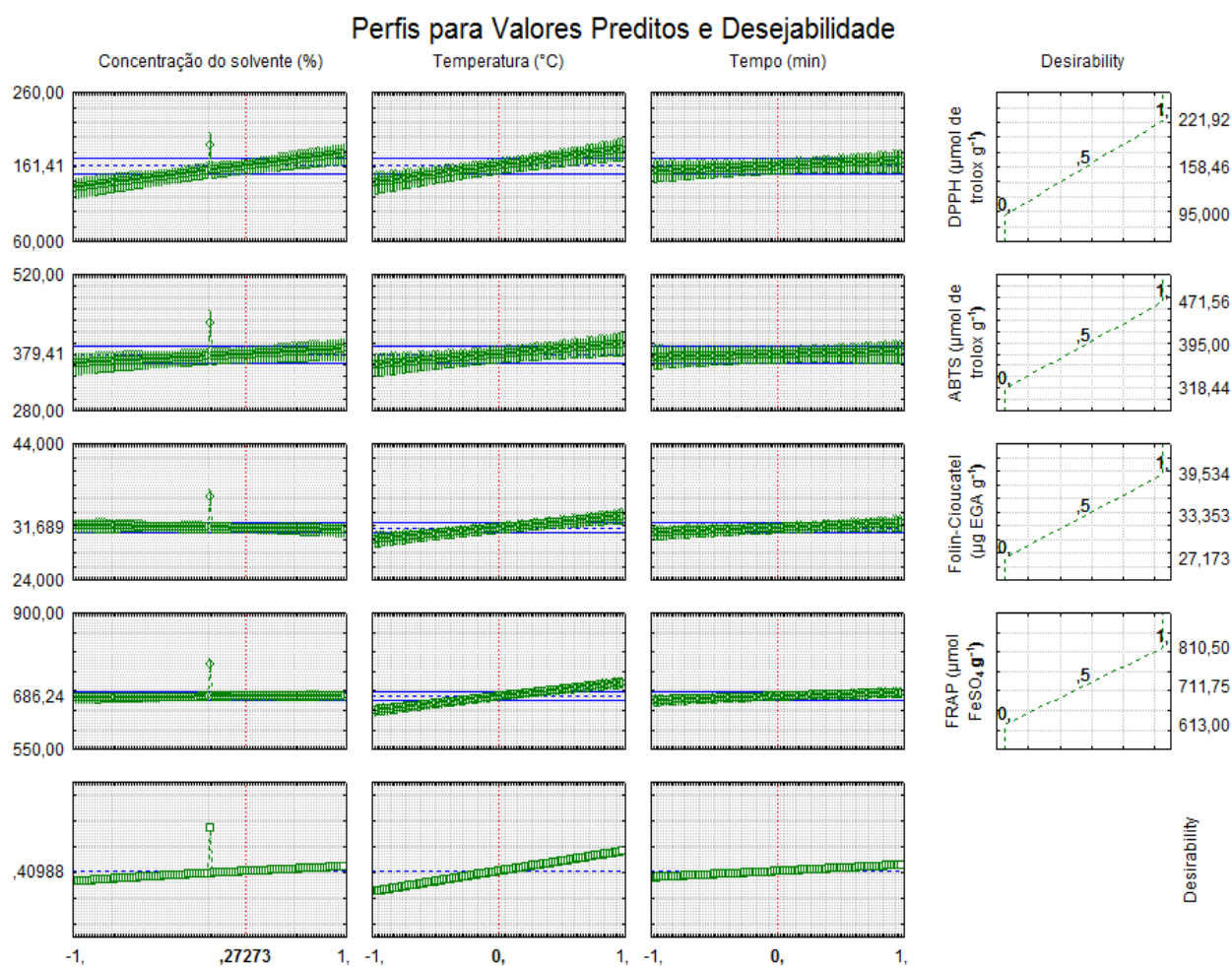
SQ – Soma dos Quadrados; GL – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio

Fonte: Dados da Pesquisa (2016).

A tabela 18 mostra que o F calculado foi 8,23 vezes maior do que o valor de F tabelado para p < 0,05 e o coeficiente de correlação do modelo foi de R<sup>2</sup> = 0,919 indicando que o modelo foi predito e adequado.

## 4.7 FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE

A função de desejabilidade é uma técnica de otimização simultânea, que utiliza métodos de programação não lineares para encontrar os valores das variáveis que otimizem uma ou mais respostas ao mesmo tempo (TEIXEIRA, 2012). As variáveis dependentes (respostas) foram todas analisadas simultaneamente para se encontrar uma condição única e simultânea que possa obter as melhores respostas para o estudo realizado. Segue abaixo o Gráfico 27.



**Gráfico 27 - Gráfico de Desejabilidade**  
**Fonte: Dados da Pesquisa (2016).**

De acordo com o Gráfico 27, o ponto central das variáveis independentes tempo e temperatura e o ponto deslocado 0,27 positivo do ponto central da variável concentração do solvente foram apontados pela função de desejabilidade como os que fornecem as melhores respostas simultaneamente. A nova condição simultânea para a resposta DPPH• apresenta o valor foi de 161,41  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ , para ABTS•<sup>+</sup> o valor é de 379,41  $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$ , para fenólicos totais o valor de 31,68  $\mu\text{g EAG.g}^{-1}$  e para FRAP o valor é de 686,24  $\mu\text{mol de FeSO}_4.\text{g}^{-1}$ .

A desejabilidade total foi igual a 0,409. Os valores de desejabilidade variam de 0 a 1, sendo zero um valor não aceitável e um o valor desejado, assim pode-se afirmar que o valor obtido de 0,409 é considerado baixo, evidenciando a dificuldade de encontrar uma única condição para todas as repostas simultaneamente.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As folhas de *Moringa oleifera* demonstram ter grande capacidade biológica devido a sua composição química, comprovadamente contendo consideráveis teores de compostos com atividade antioxidante e compostos fenólicos.

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, indicam que a melhor resposta para a avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP e ABTS foi obtida a partir da combinação do ponto central das variáveis independentes, bem como para o método de determinação do teor de fenólicos totais - Folin-Ciocalteu. A melhor resposta para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH foi obtida com a combinação dos níveis superiores (+1) das variáveis concentração do solvente etanol e temperatura e nível inferior (-1) da variável tempo de extração.

A análise estatística dos dados indica que a curvatura foi significativa para todas as respostas, isso implica na evidência de que termos quadráticos devem ser determinados, necessitando portanto de mais pontos. Neste sentido a solução é aumentar o planejamento fatorial com quatro corridas axiais, resultando em um planejamento chamado de composto central ou planejamento *Full*. Para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH, as variáveis concentração do solvente, temperatura, tempo e a interação entre concentração do solvente e tempo foram estatisticamente significativas. Para a avaliação pelos métodos de ABTS e FRAP as variáveis temperatura e a interação entre temperatura e tempo foram estatisticamente significativas. Para a resposta teor de fenólicos totais as variáveis temperatura, tempo e as interações concentração do solvente/temperatura e temperatura/tempo foram consideradas estatisticamente significativa.

Pode-se concluir que a extração sólido-líquido para as folhas da *Moringa oleifera* apresentaram valores acentuados na determinação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS E FRAP e para o teor de fenólicos totais em comparação com a literatura.

## REFERÊNCIAS

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2006.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma ( FRAP ) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento Piracicaba**. Tese, p. 96, 2010.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

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

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

DARONCHO, M. Quantificação da atividade antioxidante através de análises pelos métodos DPPH e ABTS. **VI Seminário de Nutrição da Unifra**, p. 2005–2007, 2012.

DE LIMA, P. C. G. **Estudo dos mecanismos de detoxificação e tolerância aos metais cromo e cobre em *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Pistia stratiotes* eo uso das macrófitas *Typha sp* e *Phragmites sp* na remoção de nutrientes em wetlands construídos**. Teses.Usp.Br, 2010.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: Potential terapeutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2007.

ERDOGAN, S. et al. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1592–1597, 2011.

EMPRESA, DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E. EXTENSÃO. RURAL DE SANTA CATARINA-EPAGRI. **Revista Agropecuária Catarinense**, CULTIVOS, 2013.

FATIMA, N. et al. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista De Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 71–83, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Medicina, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. O que realmente significa o valor-p? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 3713, 2015.

GONÇALVES, A. E. D. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. p. 88, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1–8, 1990.

HUAN, PRIOR, D. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. APRIL, p. 1841–1856, 2005.

NETO, Benício Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria**. Bookman Editora, 2010.

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais Piracicaba Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. Universidade de São Paulo, 2010.

OLDONI, T. L. C. et al. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2054–2062, 2015.

OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas**. p. 54, 2014.

OLIVEIRA, S. D. E. **Determinação da Capacidade Antirradicalar de Produtos Naturais Utilizando-se a Quimiluminescência Do Luminol e Ensaio Fotométrico Com Radicais Estáveis**. Universidade de São Paulo Instituto de Química. 2011.

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**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401–436, 1999.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. et al. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 246–254, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª. Campinas, 2009.

ROLEIRA, F. M. F. et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.

SEN, S. et al. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91–100, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.** *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

STREIT, N. M. et al. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.

TEIXEIRA, T. A. P. **UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS NO DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE DEFENSIVO AGRÍCOLA.** 2012.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil.** p. 103, 2010.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157–166, 2009.

VONGSAK, B. et al. **Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method.** *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 566–571, 2013.