

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

ALINE SAVI

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DE FOLHAS DE JAMBO (*Syzygium malaccense*)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2015**

ALINE SAVI

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DE FOLHAS DE JAMBO (*Syzygium malaccense*)**

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

Pato Branco – PR
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Otimização do processo de extração de compostos bioativos de folhas de jambo (*Syzygium Malaccense*)** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora Nº 8.2.2015-B de 2015.

Fizeram parte da banca os professores:

Orientadora: Dr^a. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Dr^a. Larissa Macedo dos Santos-Tonial

Dr^a. Sirlei Dias Teixeira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meu pais, João e Genecir, com todo amor e gratidão, por tudo o que fizeram por mim.

Ao Roberto por todo amor, apoio e paciência durante a graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que sempre me protege e me dá forças para seguir em frente.

Aos meus pais, João e Genecir, pelo amor, carinho, ensinamentos e exemplo de força, coragem e honestidade. Isso não seria possível sem vocês.

Ao meu irmão Anderson, que mesmo em meio a sua chatice, sempre me incentivou com muito amor e carinho.

À professora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, pela orientação, dedicação, atenção, carinho e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À professora Dra. Larissa Macedo dos Santos-Tonial, pela iniciação no caminho da pesquisa, sempre me orientando e ensinando com o maior carinho.

À professora Dra. Sirlei Dias Teixeira pelas contribuições.

À todos os funcionários e estagiários da Central de Análises e do Laboratório de Qualidade Agroindustrial – LAQUA, em especial a Roberta, pelo espaço cedido, ajuda e amizade.

À todos os amigos conquistados durante a graduação, obrigada pela atenção, amizade e companheirismos.

À Rafaela pela paciência, ajuda e ensinamentos durante este trabalho.

Ao Matheus A. Calegari, pelos ensinamentos, ajuda e pela amizade sincera desde o início da graduação. Seu sorriso de menino sempre fez com que tudo ficasse mais fácil.

À Gabrielle C. Calegari, minha amiga e confidente que vem me ajudando nos momentos bons e ruins nos últimos três anos.

Ao Roberto, que sempre buscou me ajudar nesta jornada, seu amor, carinho e principalmente paciência me deram forças para acreditar que meu sonho seria possível.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.” - Albert Einstein

RESUMO

SAVI, Aline. Otimização do processo de extração de compostos bioativos de folhas de jambo (*Syzygium malaccense*), 2015. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

O jambo vermelho (*Syzygium malaccense*) é uma planta cultivada nas regiões norte e nordeste do Brasil, que produz um fruto vermelho muito utilizado na indústria como corante e fonte de antioxidante natural, além de utilizado pela medicina popular na cura de alguns males. Trabalhos indicam a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante em várias partes do jambo vermelho, o que gera muito interesse, pois os mesmos proporcionam inúmeros benefícios à saúde humana. Até o momento poucos estudos haviam sido realizados com as folhas de jambo, e por este motivo, o trabalho teve por objetivo otimizar o processo de extração de compostos bioativos. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 , onde as variáveis dependentes foram o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante, avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH e as variáveis independentes foram tempo, temperatura e concentração de etanol. Após definida a melhor condição de extração; nível superior de tempo (45 min), nível superior de temperatura (80 °C) e nível inferior de concentração de etanol (40% v/v); o extrato foi avaliado em relação ao teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante, utilizando três métodos distintos: sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e método de redução do ferro – FRAP. O teor de compostos fenólicos para o extrato foi de $73,73 \pm 1,05$ mg EAG g^{-1} . A atividade antioxidante apresentou os seguintes valores: $666,78 \pm 4,61$ μ mol de Trolox g^{-1} para o método de sequestro do radical DPPH; $853,87 \pm 1,47$ μ mol de Trolox g^{-1} para o método de sequestro do radical ABTS e $1267,02 \pm 5,05$ μ mol de Fe^{2+} g^{-1} para a metodologia da redução do ferro – FRAP. Os resultados mostram que em relação a algumas plantas, o jambo apresenta elevados teores de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante.

Palavras-chave: atividade antioxidante, compostos fenólicos, planejamento fatorial, FRAP, ABTS, DPPH.

ABSTRACTS

SAVI, Aline. Optimization of bioactive compounds extraction process rose apple leaves (*Syzygium malaccense*), 2015. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

Red rose apple (*Syzygium malaccense*) is a plant cultivated in the northern and northeastern regions of Brazil, which produces a red fruit widely used in the industry as coloring and source of natural antioxidant, and used in folk medicine in curing some diseases. Studies indicate the presence of phenolic compounds and antioxidant activity in various parts of red rose apple, which generates much interest, because even provide numerous benefits to human health. To date few studies have been conducted with the leaves of rose apple, and for this reason, the study aimed to optimize the bioactive compounds extraction process. For this, there was a 2^3 factorial design, where the dependent variables were the total phenolic content and antioxidant activity, evaluated the kidnapping method of DPPH radical and independent variables were time, temperature and concentration of ethanol. After defined the best extraction condition, higher level time (45 min), the extract was evaluated in relation to the total phenolic content and antioxidant activity, using three different methods: kidnapping of the DPPH radical, ABTS radical capture and method reduction of iron - FRAP. The content of phenolic compounds in the extract was $73.73 \pm 1.05 \text{ mg g}^{-1}$ EAG. The antioxidant activity had the following values: $666,78 \pm 4,61 \text{ } \mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ for the kidnapping method of DPPH radical; $853,87 \pm 1,47 \text{ } \mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ for the kidnapping method of ABTS radical and $1267,02 \pm 5,05 \text{ } \mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ the methodology for the reduction of iron - FRAP. The results show that for some plants, the rose apple has a high content of phenolic compounds and high antioxidant activity.

Keywords: antioxidant activity, phenolic compounds, factorial design, FRAP, ABTS, DPPH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Syzygium malaccense</i>	16
Figura 2 - À esquerda, estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos, e à direita, estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos.....	18
Figura 3 - Reação entre o DPPH radicalar e um antioxidante genérico.	20
Figura 4 - Reação entre um radical ABTS e um antioxidante genérico.....	21
Figura 5 -Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	21
Figura 6 - Reação do ácido gálico com molibdênio VI, levando a formação de molibdênio V, detectado espectrofotometricamente.....	22
Figura 7 -Foto dos extratos resultantes da extração segundo o planejamento fatorial.	29
Figura 8 - Diagrama de Pareto para análise de fenólicos totais.	32
Figura 9 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de fenólicos totais.....	33
Figura 10 - Superfície de resposta da influência do tempo e da temperatura de extração na avaliação do teor de fenólicos totais.....	34
Figura 11 - Superfície de resposta da concentração de etanol e do tempo de extração na avaliação do teor de fenólicos totais.....	35
Figura 12 - Cromatogramas dos padrões e das amostras injetadas (1 - ácido gálico; 2 -catequina; 3 – rutina; 4 - mirecetina ; 5 – quercetina).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidroxibenzóicos.....	18
Tabela 2 - Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidroxicinâmicos.	18
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental 2 ³ , com os níveis reais e codificados das variáveis.	24
Tabela 4 - Resultados do planejamento fatorial para o processo de extração.....	30
Tabela 5 - Tabela de efeito para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH.....	30
Tabela 6 - Tabela de efeito para o teor de fenólicos totais.....	31
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para fenólicos totais.....	32
Tabela 8 - Resultados obtidos nas análises da atividade antioxidante para o extrato de folhas de jambo.	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 PRODUTOS NATURAIS NO BRASIL.....	15
3.2 <i>SYZYGIUM MALACCENSE</i>	15
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	16
3.3.1 Ácidos fenólicos	17
3.4 ANTIOXIDANTES	19
3.4.1 Sequestro do radical DPPH.....	19
3.4.2 Captura do radical ABTS.....	20
3.4.3 Método da redução do ferro – FRAP.....	21
3.4.4 Método de Folin – Ciocalteu.....	22
3.4.5 Identificação de compostos fenólicos por CLAE	22
3.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 PREPARO DA AMOSTRA	24
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO 2 ³	24
4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
4.3.1 Sequestro do radical DPPH.....	25
4.3.2 Captura do radical ABTS.....	26
4.3.3 Método da redução do ferro – FRAP.....	26
4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	27
4.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
5.2 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	36
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	36
5.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE.....	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40

REFERÊNCIAS.....41

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados desde a antiguidade na cura de doenças e males do corpo humano. Muitas culturas utilizaram estes produtos por serem a principal, ou mesmo a única matéria-prima para elaboração de medicamentos. Nos últimos anos, os produtos naturais têm se tornado fonte para o desenvolvimento de novas drogas, permitindo o avanço na descoberta de agentes terapêuticos contra doenças infecciosas, como câncer, imunodeficiências e outras. Deste modo, o valor dos produtos naturais está claramente reconhecido e identificar novos compostos bioativos e elucidar seus mecanismos de ação são os desafios que se apresentam.

O jambo vermelho (*Syzygium malaccense*) é uma planta cultivada nas regiões norte e nordeste do Brasil, a qual produz um fruto vermelho que pode ser consumido puro, e que também é muito utilizado em diversos setores da indústria como corante e fonte de antioxidante natural (AUGUSTA et al., 2010). O jambo é utilizado pela medicina popular para combater dores de cabeça e fígado (SILVA et al., 2011), como diurético e no tratamento de infecções dérmicas, do trato gastrintestinal, respiratório, em inflamações (MELO et al., 2009); além de utilizado como laxante e antidiabético (ZAMBELLI et al., 2006).

Trabalhos na literatura indicam a presença de compostos fenólicos e com atividade antioxidante nas folhas do jambo (ZAMBELLI et al., 2006). Desta forma, é importante a caracterização química e biológica destes extratos para a determinação do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante das mesmas, a fim de que se possa utilizar todos os benefícios que as folhas do jambo podem oferecer.

Os compostos com poder antioxidante, principalmente os compostos fenólicos, têm gerado muito interesse, pois os mesmos proporcionam inúmeros benefícios à saúde humana, já que sequestram os radicais livres e interrompem o processo oxidativo no corpo humano prevenindo desta forma o surgimento de doenças (HAIDA et al., 2011).

Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi otimizar o processo de extração e avaliar a atividade antioxidante na melhor condição avaliada, utilizando técnicas *in vitro* e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do extrato hidroalcoólico das folhas de jambo (*Syzygium malaccense*).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de extração e avaliar a atividade antioxidante na melhor condição de extração, utilizando técnicas *in vitro* e CLAE, do extrato hidroalcoólico das folhas de jambo (*Syzygium malaccense*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o processo de extração de compostos fenólicos e com atividade antioxidante das folhas de jambo utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta;
- Produzir o extrato hidroalcoólico das folhas do jambo na condição ideal e avaliar a atividade antioxidante por três métodos distintos, sequestro do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazina), captura do radical ABTS (2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)) e método de redução do ferro FRAP;
- Determinar o teor de fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu no extrato hidroalcoólico produzido na condição ótima.
- Identificar e quantificar, utilizando CLAE, ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido vanílico, ácido siríngico, epicatequina, rutina, ácido salicílico, miricetina, resveratrol e quercetina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS NO BRASIL

O Brasil é um país com dimensões continentais e com uma grande biodiversidade, um imenso litoral e diversificada flora. Desde a época em que aqui só habitavam os índios, as plantas já eram muito utilizadas para a cura de males e doenças, pois eram a única fonte de matéria prima. Após a colonização desenvolveu-se o comércio de especiarias, que nada mais são do que produtos naturais. Com o passar dos anos, os produtos naturais utilizados no desenvolvimento de novas drogas só aumentaram, e desta forma, abre-se um campo cada vez maior de pesquisa (VIEGAS JR et al., 2006; PUPO et al., 2007).

Os pesquisadores dedicados à área de produtos naturais têm à mão a matéria prima mais abundante e diversificada do planeta em território nacional. Estima-se que o Brasil tenha 20% do patrimônio genético do mundo, onde o índice de endemismo, quando uma espécie ocorre apenas em uma região geográfica, é altíssimo (PINTO et al., 2002; BARREIRO et al., 2009), apesar de pouco estudado.

3.2 *SYZYGIUM MALACCENSE*

O jambo vermelho (*Syzygium malaccense*) pertence à família Myrtaceae, o qual tem origem na Malásia e foi introduzido posteriormente na África e América. No Brasil, ele ganhou espaço principalmente na região norte e nordeste (Donadio et al., 1998). É uma árvore frutífera exótica, sendo também apreciada como árvore de sombra (Figura 1). Árvore perenifólia de copa densa e piramidal, pode ter de 7 até 13 metros de altura, suas folhas são simples, duras, sem pelos, verde-escuras e brilhantes, tendo no máximo 30 cm de comprimento. Tem floração de abril a junho e suas flores são dominadas por numerosos estames de cor vermelho púrpura (LORENZI et al., 2006).



Figura 1 - *Syzygium malaccense*

Fonte: Site Multivias.

Augusta et al. (2012), caracterizaram, utilizando técnicas espectroscópica e cromatográfica, o extrato produzido a partir da casca do jambo e identificaram compostos com atividade antioxidante. Costa (2010) realizou estudo com o fruto do jambo e os resultados também demonstraram elevada atividade antioxidante, além de um alto teor de compostos fenólicos totais e flavonoides. Contudo, existem poucos estudos na literatura realizados com as folhas do *Syzygium malaccense*, o que ressalta a importância deste trabalho em caracterizar quimicamente o extrato produzido a partir das folhas de jambo.

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

“Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou de polímeros, o que lhes confere uma estrutura antioxidante” (GALLICE, 2010, p.13) e agem na redução ou inibição da oxidação de células ou moléculas, e por isso têm atividade antioxidante.

As maiores fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares estão principalmente em frutas de coloração azul/vermelha (GALLICE, 2010). Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos, os flavonoides e os não flavonoides. O grupo dos flavonoides é composto pelos flavanóis (catequina, epicatequina), pelos flavonóis (caempferol, quercetina, turina e miricetina), pelas antocianidina, flavonas, flavanonas, entre outros. Já o grupo dos não flavonoides é composto pelos ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos e os estilbenos (MONARETTO, 2013; ABE, et al. 2007; CABRITA, RICARDO-DA-SILVA, LAUREANO, 2003).

3.3.1 Ácidos fenólicos

Segundo Stalikas (2007), ácido fenólico são fenóis que apresentam ácidos carboxílicos em sua estrutura. Os ácido fenólicos são metabólitos secundários, tem uma estrutura simples, composta por um anel aromático e grupamentos (geralmente hidroxilas e radicais metil) distribuídos em sua estrutura (JARDINI et al., 2010). São divididos em dois grupos os hidroxibenzóicos e os hidroxicinâmicos, embora a estrutura de base seja a mesma, o número e as posições das hidroxilas no anel aromático estabelecem uma diferença (STALIKAS, 2007 apud MONARETTO, 2013).

3.3.1.1 Ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos têm estruturas muito semelhantes como mostrado na figura abaixo.

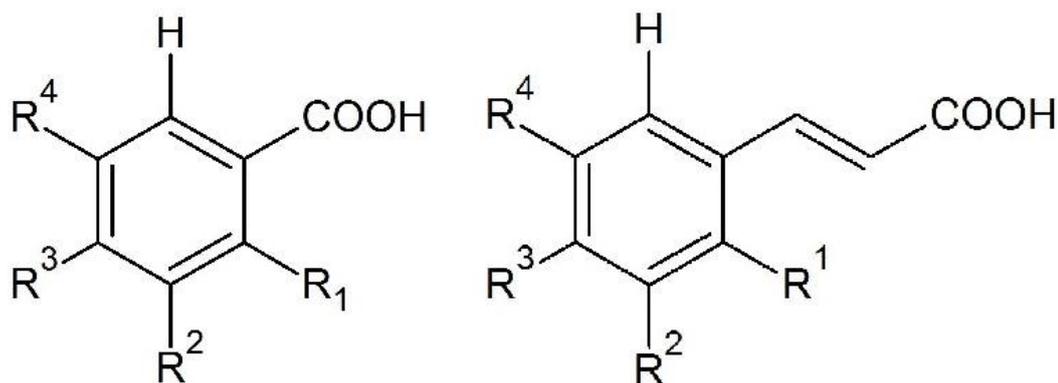


Figura 2 - À esquerda, estrutura geral dos ácidos hidroxibenzoicos, e à direita, estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 1 são mostrados os radicais e posições que formam as estruturas básicas dos principais ácidos hidroxibenzoicos.

Tabela 1 – Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidroxibenzoicos.

Nome	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Ácido benzoico	H	H	H	H
Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido salicílico	OH	H	H	H

Fonte: STALIKAS (2007), com algumas modificações.

Na Tabela 2 estão expostos os radicais que formam as estruturas básicas dos principais ácidos pertencente ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos.

Tabela 2 - Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidroxicinâmicos.

Nome	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Ácido cinâmico	H	H	H	H
Ácido <i>o</i> -cumárico	OH	H	H	H
Ácido <i>m</i> -cumárico	H	OH	H	H
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	OH	H
Ácido ferúlico	H	OCH ₃	OH	H

Ácido caféico	H	OH	OH	H
---------------	---	----	----	---

Fonte: STALIKAS (2007), com algumas modificações.

3.4 ANTIOXIDANTES

Uma ampla definição de antioxidante é: “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995).

O combate a radicais livres está intimamente ligado ao combate de muitas doenças, e os antioxidantes são conhecidos por exercer essa função. Muitos antioxidantes são obtidos através de nossa própria alimentação, e por isso, diversos métodos que auxiliam na determinação da atividade antioxidante dos alimentos são estudados (VEDANA, 2008).

Existem vários métodos que podem ser utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, isso se deve ao fato de que existem diferentes tipos de radicais livres e diversas formas de atuação dos mesmos nos organismos vivos, o que dificulta a utilização de apenas um método para determinação da atividade antioxidante de diferentes radicais (ALVES et al., 2010).

No presente trabalho, serão utilizados os seguintes métodos na determinação da atividade antioxidante: sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), captura do radical ABTS e o método da redução do ferro (FRAP), os quais serão descritos posteriormente.

3.4.1 Sequestro do radical DPPH

O DPPH é uma molécula radicalar, pois contém um elétron livre. O método consiste basicamente em medir a capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 3), reduzindo-o a hidrazina. Quando adicionada a uma solução alcóolica de DPPH uma substância que é

doadora de átomos de hidrogênio, a hidrazina é obtida com mudança na coloração de violeta a amarelo pálido. A coloração violeta em solução alcóolica apresenta uma banda de máxima absorção no comprimento de onda de 517 nm (ALVES et al.,2010; Melo, 2010).

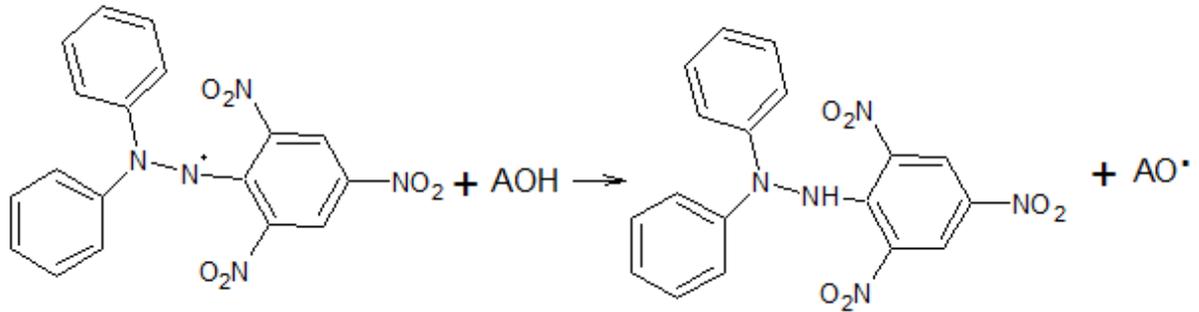


Figura 3 - Reação entre o DPPH radicalar e um antioxidante genérico.

Fonte: Autoria própria

3.4.2 Captura do radical ABTS

Há a necessidade de preparar o radical ABTS, por via química ou enzimática. Segundo a metodologia sugerida por Re et al. (1999), o radical ABTS é formado por uma reação de redução do ABTS pelo persulfato de potássio. A atividade antioxidante é determinada pela mudança de coloração do radical ABTS, que inicialmente é verde, ao reagir com os antioxidantes presentes na amostra, a mudança de coloração é medida pela absorbância em 734 nm. Para determinar o poder antioxidante da amostra é preciso comparar a absorbância da mistura ABTS amostra com a absorbância da mistura ABTS com um antioxidante sintético padrão, neste caso Trolox, o resultado é expresso em TEAC.g⁻¹ (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) (VEDANA, 2008; OLDONI, 2010).

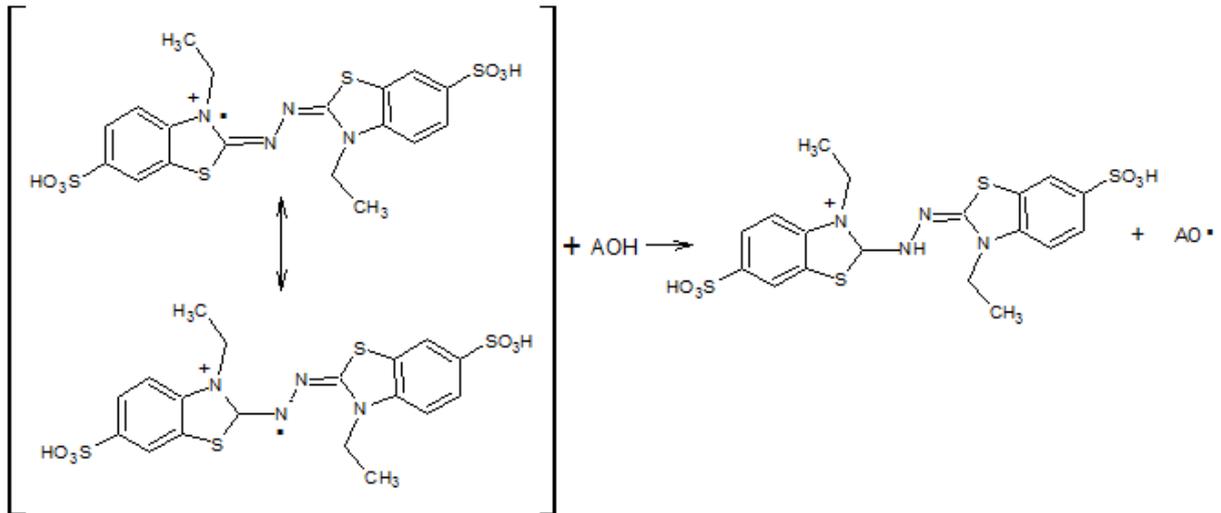


Figura 4 - Reação entre um radical ABTS e um antioxidante genérico.

Fonte: Autoria própria

3.4.3 Método da redução do ferro – FRAP

Este é um método de avaliação da atividade antioxidante através da redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ) a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} - TPTZ), em meio ácido, pelos antioxidantes presentes, neste caso pelos agentes antioxidantes naturais presentes no extrato do jambo (figura 5). Porém, nem todos os antioxidantes presentes reduzem o ferro, assim como outras substâncias presentes podem reduzir de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Mesmo assim, esse método é muito utilizado, juntamente com outros ensaios, em análises de antioxidantes presentes em plantas e alimentos (OLDONI, 2010; PINELI, 2009).

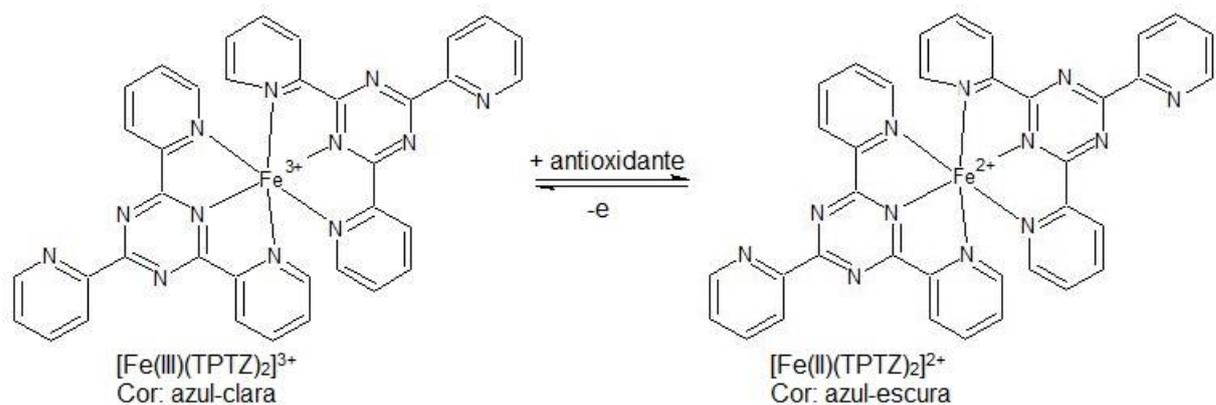


Figura 5 -Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+} .

Fonte: Autoria própria.

3.4.4 Método de Folin – Ciocalteu

O método de Folin – Ciocalteu é utilizado para medir o teor total de compostos fenólicos. Consiste na reação entre os fenóis e o reagente Folin – Ciocalteu, que envolve a mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio. A desprotonação dos fenólicos acontece em meio básico, o que gera os ânions fenolatos. Nessa reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente Folin ocorre a redução do molibdênio que anterior a redução se encontrava no estado de oxidação (VI) (Figura 6), mudando a coloração do meio reacional de amarela para azul. Um dos problemas desse método é que muitas substâncias podem interferir na análise como, vitamina C, açúcares e as aminas aromáticas (OLIVEIRA, 2011).

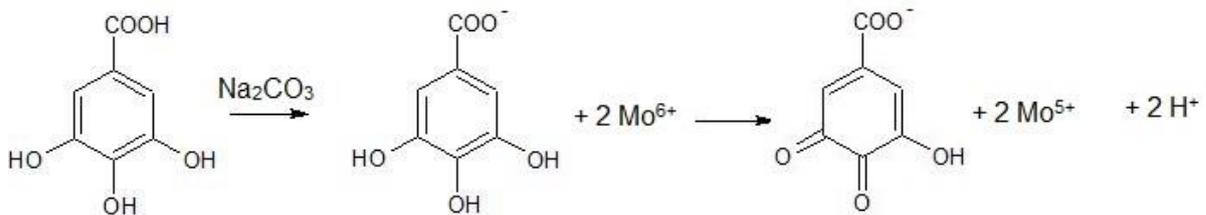


Figura 6 - Reação do ácido gálico com molibdênio VI, levando a formação de molibdênio V, detectado espectrofotometricamente.

Fonte: Autoria própria.

3.4.5 Identificação de compostos fenólicos por CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação capaz de realizar separações de misturas bastante complexas e análises quantitativas de vários compostos, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS et al. 2009).

Utilizando essa técnica, os principais ácidos fenólicos podem ser identificados, comparando o tempo de retenção e a similaridade espectral entre os padrões ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vanílico, e as amostras.

3.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Existem diversas metodologias para extração de compostos bioativos, nas quais muitos parâmetros podem ser alterados, como o solvente utilizado, o tempo de extração, a temperatura de extração, o tamanho das partículas, além da natureza do vegetal. Devido a isso, fica muito difícil selecionar a metodologia mais eficiente para extração desses compostos (SHAIDI; NACZK, 1995, apud ANDREO; JORGE, 2006).

Não é possível afirmar que existe um solvente ideal para a extração de compostos bioativos, pois nenhum solvente é capaz de isolar todos esses compostos. Nos vegetais os compostos bioativos estão presentes em diferentes quantidades, além da grande variedade existente que dificulta a escolha do solvente a ser utilizado (SHAIDI; NACZK, 1995, apud ANDREO; JORGE, 2006).

Encontra-se na literatura trabalhos utilizando diversos solventes como etanol (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013), etanol acidificado com ácido clorídrico (AUGUSTA et al., 2012), metanol (DE MORAIS et al., 2009), acetato de etila, acetona, éter etílico, hexano, álcool metílico e tetrahidrofurano (JARDINI et al., 2010), entre outros.

O tempo de extração é outro fator que influencia na extração de compostos bioativos. O tempo de extração pode variar de 1 minuto até 24 horas. Porém, períodos longos de extração podem causar oxidação dos fenólicos sendo necessário que agentes redutores sejam adicionados ao solvente do sistema (SHAIDI; NACZK, 1995, apud ANDREO; JORGE, 2006).

Outro fator que pode afetar a eficiência do processo de extração é a temperatura. Quando a temperatura é elevada, as taxas de difusão e solubilidade dos analitos aumenta; a viscosidade e tensão superficial dos solventes diminuem, facilitando o contato dos analitos com os solventes, o que pode acelerar o processo de extração. Porém, temperaturas altas podem acarretar na degradação dos compostos bioativos diminuindo assim o rendimento da extração (ATES et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DA AMOSTRA

Primeiramente, as folhas foram secas em estufa a 35 °C por aproximadamente 5 dias, na sequência foram trituradas em moinho Willye TE-650, marca Tecnal.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO 2³

Com o objetivo de determinar a condição ideal de extração dos compostos bioativos, foi realizado um planejamento fatorial 2³ onde foram testadas a influência significativa de algumas variáveis do processo de extração. As variáveis independentes testadas foram tempo de extração, temperatura de extração e concentração de etanol (v/v). As variáveis dependentes testadas foram a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH e o teor de fenólicos totais, sendo esses os métodos escolhidos por serem muito utilizados na quantificação da atividade antioxidante em plantas.

A Tabela 3 apresenta os níveis reais e os níveis codificados utilizados no planejamento fatorial das análises; onde -1 representa o nível inferior, 0 o ponto central e +1 o nível superior. O planejamento teve um total de 9 experimentos com diferentes combinações entre as variáveis, considerando as análises em triplicata no ponto central temos um total de 11 experimentos. As análises no ponto central são importantes para verificar a reprodutibilidade do processo.

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental 2³, com os níveis reais e codificados das variáveis.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de etanol (v/v)
1	30 (-1)	15 (-1)	40 (-1)
2	80 (+1)	15 (-1)	40 (-1)
3	30 (-1)	45 (+1)	40 (-1)
4	80 (+1)	45 (+1)	40 (-1)

5	30 (-1)	15 (-1)	80 (+1)
6	80 (+1)	15 (-1)	80 (+1)
7	30 (-1)	45 (+1)	80 (+1)
8	80 (+1)	45 (+1)	80 (+1)
9	55 (0)	30 (0)	60 (0)
10	55 (0)	30 (0)	60 (0)
11	55 (0)	30 (0)	60 (0)

Fonte: Autoria própria.

Os níveis superiores e inferiores de temperatura foram escolhidos para que o nível inferior ficasse próximo da temperatura ambiente e o nível superior não degradasse os compostos bioativos presentes. Os valores da variável tempo foram assim determinados para que fosse possível avaliar os resultados obtidos quando o material ficava um tempo menor em exposição ao solvente e a um tempo maior, mas que o mesmo não representasse um valor muito elevado para que o tempo de preparo do extrato não ficasse muito elevado. Os níveis superiores e inferiores de concentração de etanol focando em um consumo baixo de etanol para minimizar custos e também em um nível superior para realmente analisar a influência da concentração de etanol na extração.

O preparo dos extratos foi realizado a partir de 2 g do material previamente seco e triturado (Item 4.1), sendo adicionados 25 mL da mistura etanol:água (v/v) nas diferentes concentrações. As misturas foram aquecidas em banho termostaticado, sem agitação constante, utilizando as temperaturas e os tempos estabelecidos no planejamento experimental (Tabela 3). Na sequência, os extratos foram resfriados a temperatura ambiente e filtrados utilizando papel filtro qualitativo.

4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.3.1 Sequestro do radical DPPH

Para determinar a quantidade sequestrante do radical DPPH foi utilizada a metodologia proposta por Brand-Willians et al. (1995). Foram adicionados 0,5 mL dos padrões ou das amostras diluídas, 1:600 v/v, previamente diluídas em tubos de ensaio e na sequência adicionados 3,0 mL de etanol e 0,3 mL do radical DPPH, em solução de etanol ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Após 45 minutos de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

Foi utilizado como padrão o antioxidante sintético Trolox, para o preparo da curva padrão, em concentrações que vão de 15, 25, 50, 75 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Trolox, sendo em seguida construído um gráfico de calibração. Os resultados são expressos em μmol de Trolox por grama de jambo. Com a o auxílio da curva foi possível determinar a capacidade antioxidante das amostras por esse método.

4.3.2 Captura do radical ABTS

A metodologia utilizada para determinar a captura do radical ABTS foi a sugerida por Re et al. (1999). A formação do radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ foi obtida a partir da reação de 7 mmol.L^{-1} de ABTS com 140 mmol.L^{-1} de persulfato de potássio, deixada à temperatura ambiente na ausência de luz num período de 16 horas. A solução de etanol foi diluída com a solução do radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ até obter uma absorbância de 0,700 em 734 nm. Em tubo de ensaio foram adicionados $30 \mu\text{L}$ de amostra diluída, 1:50v/v, e 3 mL da solução contendo o radical. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, a 734 nm após 6 minutos de reação. Para a construção da curva padrão foi utilizado o antioxidante sintético padrão Trolox nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500, $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μmol de Trolox por grama de jambo.

4.3.3 Método da redução do ferro – FRAP

Para determinar a redução do ferro foi utilizada a metodologia sugerida por Benzie e Strain (1996). O reagente FRAP é preparado por meio da mistura de 25

mL de uma solução de tampão acetato (300 mmol.L^{-1} , pH 3,6), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mmol.L^{-1} TPTZ em 40 mmol.L^{-1} HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mmol.L^{-1}) em solução aquosa. Em tubo de ensaio foram adicionados 100 μL da amostra previamente diluída, 1:400 v/v, e 3 mL do reagente FRAP e deixadas no escuro à 37°C em banho-maria por 30 minutos. Em espectrofotômetro foi medida a absorbância em 595 nm. A curva de calibração foi construída utilizando sulfato ferroso nas concentrações 200, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e os resultados expressos em mmol de Fe^{2+} por grama de jambo.

4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada seguindo o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, sugerido por Singleton (1999). À uma alíquota de 0,5 mL da amostra, diluída, 1:250 v/v, foi adicionado 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10). Após 5 minutos de repouso da mistura, foi adicionado 2,0 mL de uma solução de Na_2CO_3 (4%). As soluções ficaram encubadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente e após 2 horas foram realizadas as leituras da absorbância a 740 nm. Foi utilizado como padrão de referência o ácido gálico e a curva foi construída utilizando as concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em mg equivalente ao padrão ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g^{-1}).

4.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

Para a determinação de fenólicos totais foram usados padrões para identificar e quantificar a presença dos seguintes compostos fenólicos por CLAE. Os padrões utilizados foram ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido vanílico, ácido sirínico, epicatequina, rutina, ácido salicílico, miricetina, resveratrol e quercetina.

Para identificação dos ácidos fenólicos foi utilizado sistema CLAE, coluna C-18 fase reversa (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Varian, mantida a 30°C. A fase móvel utilizada era constituída por 2% de ácido acético em água ultra pura (solvente A), e 2% de ácido acético, 40% de acetonitrila em água ultra pura (solvente B) em modo gradiente. A vazão foi de 1 mL por minuto. Serão injetados 10 µL dos extratos em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos. Os compostos serão identificados por comparação do tempo de retenção e absorção característica dos padrões na região ultravioleta. A metodologia utilizada neste trabalho foi desenvolvida pelo grupo de estudos coordenado pela Prof. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental foi desenvolvido com o objetivo de verificar se as variáveis: temperatura de extração, tempo de extração e concentração de etanol; influenciam significativamente no processo de extração dos compostos bioativos. Os extratos obtidos sob diferentes condições apresentaram coloração distinta (Figura 7), o que pode indicar variação na composição química dos mesmos.

Foi possível identificar que a variável independente responsável pela variação da coloração dos extratos foi a concentração de etanol, desta forma, foi esperado que a concentração de etanol apresentasse diferença significativa. A coloração também induziu a acreditar que o extrato 7 apresentaria maior atividade antioxidante que os demais devido a sua coloração mais intensa.

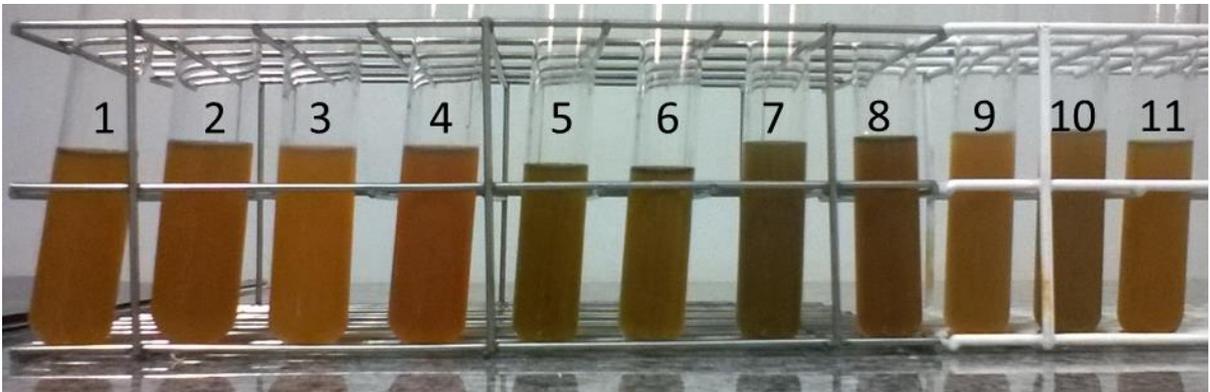


Figura 7 -Foto dos extratos resultantes da extração segundo o planejamento fatorial.

Fonte: Autoria própria.

Uma análise visual dos extratos permite inferir que os mesmos se separam em 3 grupos quanto a coloração, sendo o primeiro composto pelos extratos 1, 2, 3 e 4, o segundo pelos extratos 5, 6, 7 e 8, e o terceiro pelos extratos 9, 10 e 11. Conforme o planejamento fatorial esta separação esta de acordo com a concentração de etanol empregada na extração. Contudo, é importante destacar que dentre de cada grupo observa-se ainda, uma pequena variação na coloração dos extratos, características das variações de tempo e temperatura de extração.

A influência das variáveis foi avaliada através da resposta obtida nas análises da atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH e pelo teor de compostos fenólicos totais (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do planejamento fatorial para o processo de extração.

Corrida	DPPH ($\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$)	Fenólicos Totais (mg EAG g^{-1})
1	563,99 \pm 11,53	56,24 \pm 2,10
2	596,71 \pm 11,53	58,11 \pm 2,10
3	519,95 \pm 13,83	54,56 \pm 0,26
4	666,78 \pm 4,61	73,73 \pm 1,05
5	546,06 \pm 32,27	53,63 \pm 2,10
6	591,79 \pm 0,00	54,01 \pm 0,53
7	652,04 \pm 11,53	60,14 \pm 0,79
8	655,24 \pm 16,14	68,32 \pm 1,84
9	601,48 \pm 9,22	67,58 \pm 1,31
10	627,65 \pm 13,83	62,57 \pm 3,68
11	575,46 \pm 18,44	63,68 \pm 2,63

Fonte: Autoria própria.

É possível inferir que o ensaio que apresentou a um maior valor de atividade antioxidante no método do sequestro do radical DPPH e também maior teor de compostos fenólicos totais foi o ensaio 4, que é proveniente da combinação dos nível superior de tempo, nível superior de temperatura de extração e do nível inferior de concentração de etanol.

Para verificar a diferença estatística dos resultados e afirmar quais as variáveis significativas e quais não são significativas, os resultados foram submetidos ao tratamento estatístico, utilizando o software Environment R (versão 3.1.1).

A Tabela 5 apresenta os valores dos efeitos principais e de interação estimados para o método de sequestro do radical DPPH. Onde t é o fator de Student, p é a probabilidade e L.C. são os limites negativos e positivos de confiança.

Tabela 5 - Tabela de efeito para a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH.

Variáveis ¹	Efeito	Erro	tcal	P	L.C. (-)	L.C. (+)
------------------------	--------	------	------	---	----------	----------

Média	599,741	10,048	59,686	0,000	571,843	627,640
Temperatura	57,118	23,565	2,424	0,072	-8,310	122,546
Tempo	48,867	23,565	2,074	0,107	-16,561	114,295
Concentração	24,424	23,565	1,036	0,358	-41,004	89,852
Temperatura x Tempo	17,893	23,565	0,759	0,480	-47,535	83,321
Temperatura x Concentração	-32,656	23,565	-1,386	0,238	-98,084	32,772
Tempo x Concentração	35,850	23,565	1,521	0,203	-29,578	101,278

Fonte: Autoria própria.

Na análise pelo método de sequestro do radical DPPH, a um nível de 95% de confiança, pode-se comprovar que todos os efeitos principais; temperatura, tempo e concentração; e as interações temperatura x tempo, temperatura x concentração e tempo x concentração não apresentaram diferença significativa.

A Tabela 6 apresenta os valores dos efeitos principais e de interação estimados para o teor de fenólicos totais.

Tabela 6 - Tabela de efeito para o teor de fenólicos totais.

Variáveis	Efeito	Erro	t cal	P	L.C. (-)	L.C. (+)
Média	61,1426	1,3031	46,9196	0,0000	57,5245	64,7607
Temperatura	7,3989	3,0561	2,4210	0,0727	-1,0863	15,8841
Tempo	8,6909	3,0561	2,8438	0,0467	0,2058	17,1761
Concentração	-1,6303	3,0561	-0,5334	0,6220	-10,1154	6,8549
Temperatura x Tempo	6,2732	3,0561	2,0527	0,1094	-2,2119	14,7584
Temperatura x Concentração	-3,1209	3,0561	-1,0212	0,3649	-11,6060	5,3643
Tempo x Concentração	1,7189	3,0561	0,5624	0,6038	-6,7663	10,2040

Fonte: Autoria própria.

Para a análise do teor de fenólicos totais, utilizando um nível de 95 % de confiança, pode-se comprovar que o efeito principal tempo de extração foi significativo no processo. Porém os demais efeitos principais; temperatura de extração e concentração de etanol; e as interações temperatura x tempo, temperatura x concentração e tempo x concentração não apresentaram diferença significativa.

Na Figura 8 é possível visualizar o Diagrama de Pareto, o qual apresenta os efeitos das variáveis estudadas e suas interações, os efeitos são considerados

significativos quando se encontram acima da linha vermelha que pode ser visualizada no diagrama.

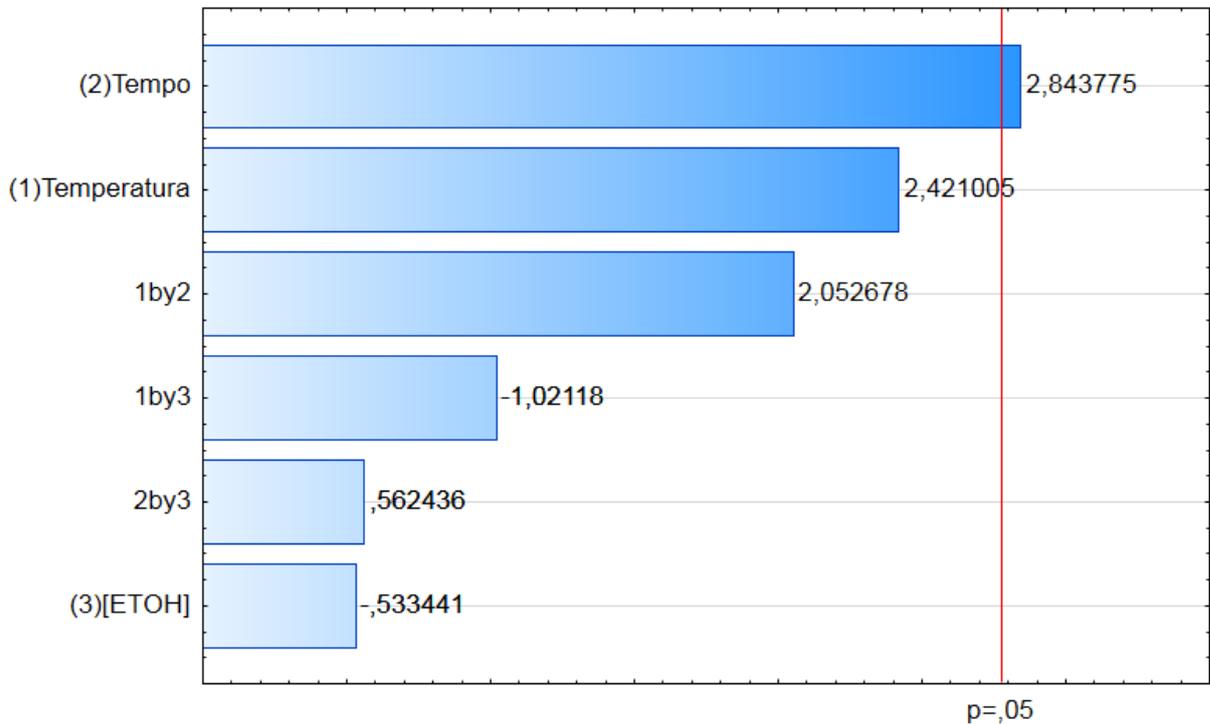


Figura 8 - Diagrama de Pareto para análise de fenólicos totais.

Fonte: Autoria própria.

A Equação (1), onde X_3 corresponde ao tempo de extração descreve o modelo obtido a partir do tratamento estatístico dos dados e foi gerada através dos efeitos significativos e dos valores codificados das variáveis.

$$\text{Fenólicos Totais (mg EAG g}^{-1}\text{)} = 61,14 + 4,34X_3 \quad (1)$$

A análise de variância (ANOVA) é o método mais utilizado para avaliar a qualidade do ajuste de um modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Na Tabela 7 podemos visualizar a análise de variância para fenólicos totais.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para fenólicos totais.

Fator ²	SS	GL	MQ	Fcal
Modelo	369,96	1	369,96	44,56
Erro	74,72	9	8,30	

Total SQ	444,68	10
F _{tab} = 1, 9, 0,05 = 5,12		F _{cal} /F _{tab} = 8,10
F _{tab} = 1, 9, 0,01= 10,56		F _{cal} /F _{tab} = 4,22
R ² = 0,832		
Fonte: Autoria própria.		

A análise de variância nos mostra que o modelo para o teor de fenólicos totais é estatisticamente significativo e preditivo, devido ao fato de que o valor de F calculado foi 8,10 vezes maior que o F tabelado à um nível de confiança de 95% (HAIR et al., 2009). O coeficiente de determinação (R²), que deve ser o mais próximo possível de 1 para que o modelo seja capaz de prever os dados, mostra que o modelo é adequado para prever os dados, pois, apresenta um R² igual a 0,832.

Na figura 8 é possível observar o gráfico de valores observados x valores preditos, o qual auxilia a verificar a qualidade do ajuste do modelo aos dados. Para que o ajuste do modelo aos dados tenha uma boa qualidade é necessário que os dados se ajustem à reta. Pode-se observar que os valores apresentam desvio em relação aos valores preditos, porém, ainda assim é possível dizer que existem um bom ajuste do modelo aos dados para a análise do teor de fenólicos totais.

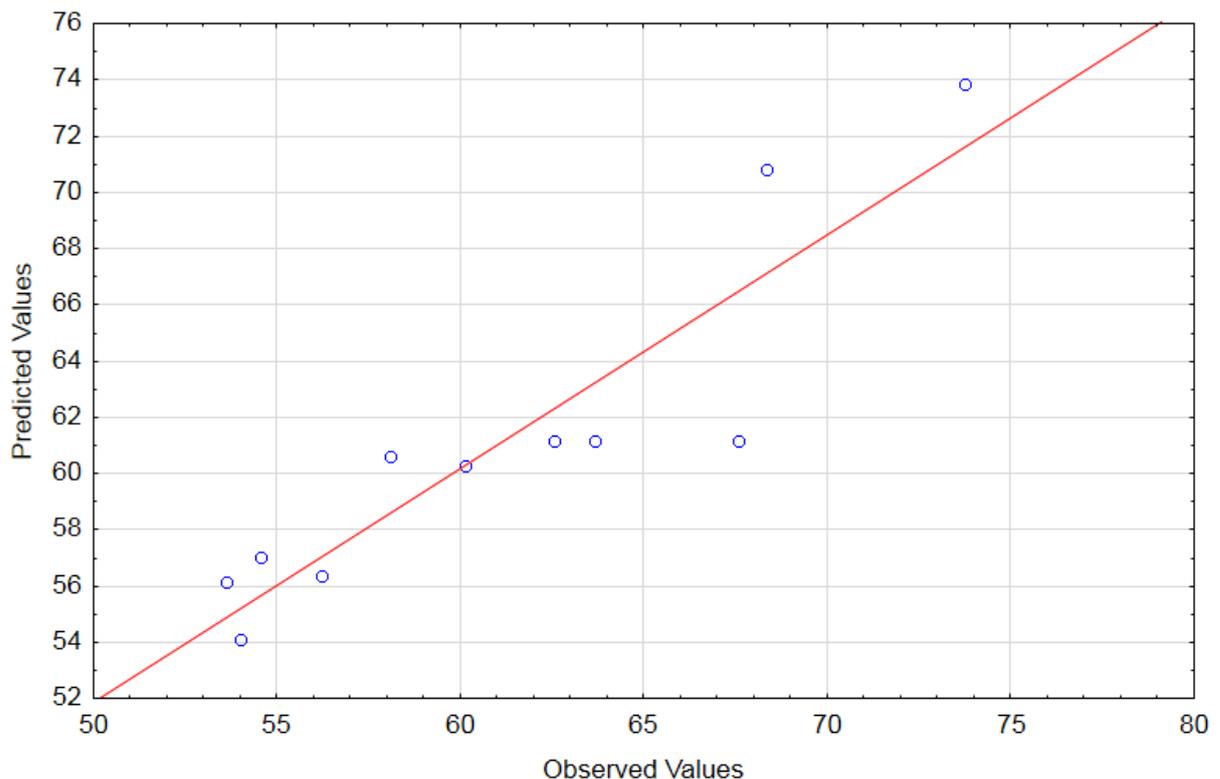


Figura 9 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de fenólicos totais.

Fonte: Autoria própria.

As superfícies de resposta apresentadas tempo x temperatura, tempo x concentração de etanol; apresentadas figuras 9 e 10, respectivamente; mostram a influência das variáveis independentes na variável resposta. Cada superfície de resposta é gerada pela combinação de duas variáveis independentes em relação a variável dependente, no caso, o teor de fenólicos totais.

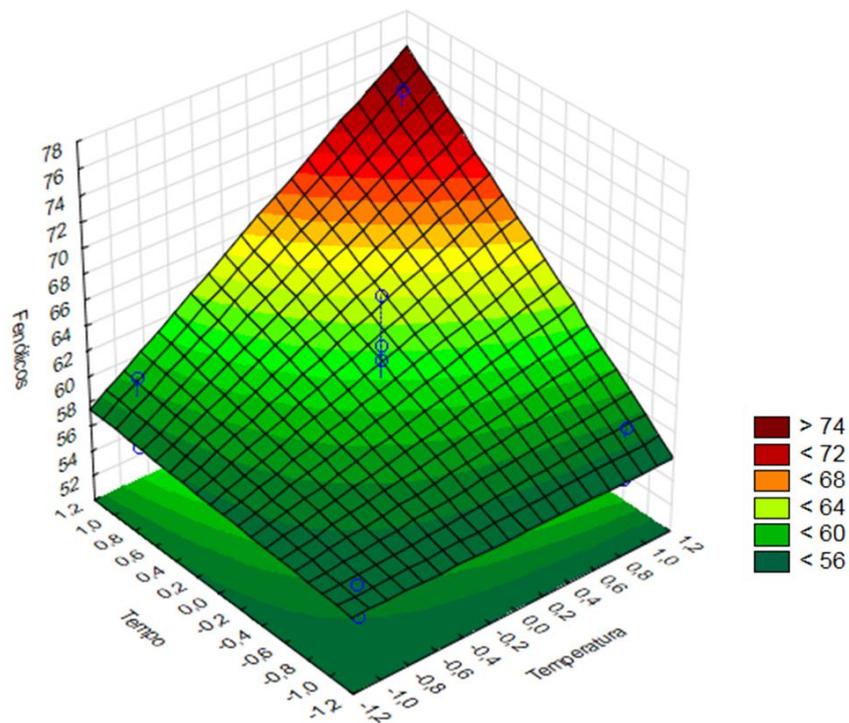


Figura 10 - Superfície de resposta da influência do tempo e da temperatura de extração na avaliação do teor de fenólicos totais.

Fonte: Autoria própria.

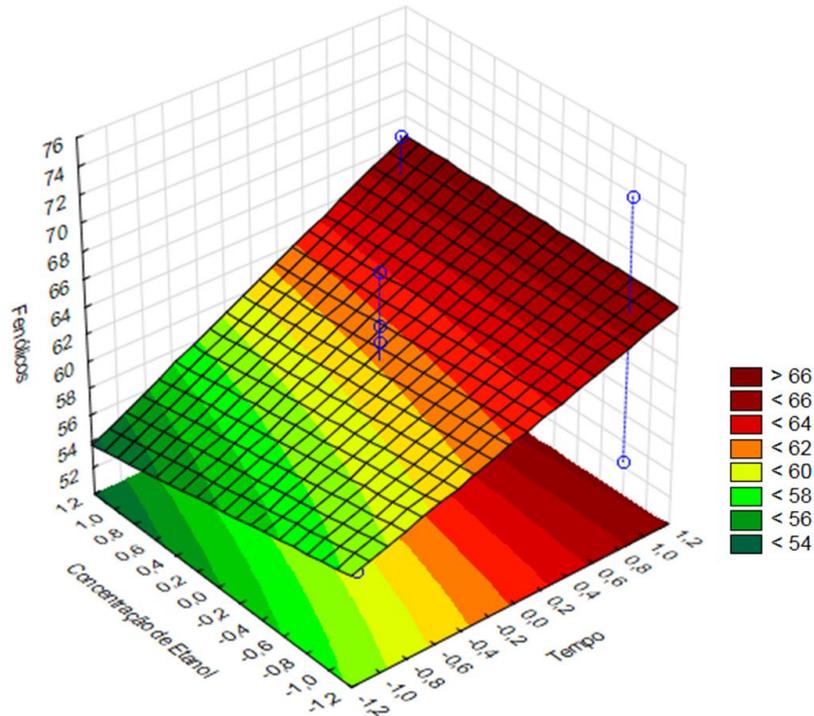


Figura 11 - Superfície de resposta da concentração de etanol e do tempo de extração na avaliação do teor de fenólicos totais

Fonte: Autoria própria.

O teor de fenólicos totais atingiu seu máximo quando foi utilizado os níveis superiores da variável tempo (45 min). A condição definida como ótima para a extração foi o nível superior de tempo (45 min), devido ao fato de ser estatisticamente significativo para o processo de extração; nível superior de temperatura (80 °C), que não é uma variável estatisticamente significativa, portanto não importa qual nível seja o escolhido; e nível inferior de etanol (40%) que também não se mostrou, essa foi a condição definida como ideal por apresentar os maiores valores de fenólicos totais e para o método do sequestro do radical DPPH. Essa condição é composta pelo nível superior de tempo que é a única variável significativa para o processo de extração e foram realizadas as análises de fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante por três métodos *in vitro* distintos. Em comparação, Oldoni et al. (2015) obteve a condição ótima quando utilizou os níveis superiores das variáveis independentes enquanto que neste trabalho a condição ótima foi obtida usando apenas dois níveis superiores das variáveis independentes tempo e temperatura.

5.2 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

O resultado obtido para a análise de fenólicos totais pelo método que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu foi de $73,73 \pm 1,05$ mg EAG g^{-1} .

Não foi encontrado na literatura trabalhos que quantifiquem o teor de fenólicos totais nas folhas de jambo, porém existem trabalhos que fazem a quantificação de compostos fenólicos na casca do jambo.

Augusta et al. (2010) encontrou $3,005$ mg de EAG g^{-1} de antocianinas na casca do jambo, o que mostra que a casca do jambo é uma fonte rica em antocianinas. Podemos ver que o teor de fenólicos totais encontrados na folha do jambo é muito maior do que o de antocianinas na casca do mesmo, isso já era um resultado esperado, pois as antocianinas são apenas uma classe dos compostos fenólicos.

Veber et al. (2015) quantificou o teor de fenólicos totais em extratos de folhas de jambolão (*Syzygium cumini*) e encontrou $2,21$ mg EAG g^{-1} , quando comparamos este resultado aos encontrados nos extratos de folhas de jambo podemos ver que o mesmo possui um teor de fenólicos totais muito maior.

Trabalhos realizam a quantificação de fenólicos totais em outras plantas. O mastruz, por exemplo, apresenta um teor de fenólicos de $0,3887$ mg de EAG g^{-1} e o capim santo um teor de $0,4305$ mg de EAG g^{-1} . (AZEVEDO et al., 2011); o extrato de folhas de *Pereskia. aculeata Mill.* apresentou um teor de fenólicos de $95,6$ mg de EAG g^{-1} segundo Sousa et al. (2014).

Comparando o resultado encontrado no presente trabalho com os resultados encontrados para mastruz e capim santo por Azevedo et al. (2011), o teor de fenólicos no extrato de folhas de jambo é muito maior. Quando comparado com o extrato das folhas de *Pereskia aculeata Mill.* obtidos por Sousa et al. (2014) temos resultados próximos.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na tabela 9 são apresentados os resultados obtidos para a avaliação da atividade antioxidante pelos três métodos *in vitro*; DPPH, ABTS e método da redução do ferro - FRAP.

Tabela 8 - Resultados obtidos nas análises da atividade antioxidante para o extrato de folhas de jambo.

Método	Concentração
DPPH ($\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$)	666,78 \pm 4,61
ABTS ($\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$)	853,87 \pm 1,47
FRAP ($\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$)	1267,02 \pm 5,05

Augusta et al. (2013) quantificou a atividade antioxidante pelo método do DPPH em flores de jambo obtendo um valor de 22,64 $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$; que quando comparado com o valor encontrado para o extrato de folhas de jambo é muito pequeno.

Almeida (2013) determinou a atividade antioxidante em tomilho utilizando os métodos ABTS e FRAP. Pelo método ABTS foi encontrado um teor de antioxidantes equivalente a 265,79 \pm 3,02 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, pelo método de redução do ferro – FRAP o teor de antioxidantes encontrado foi de 314,72 \pm 6,04 $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$. Quando se faz a comparação dos resultados obtidos para o extrato das folhas do jambo com os resultados obtidos por Almeida (2013), é possível observar que, tanto para FRAP quanto para ABTS, os resultados das análises dos extratos de jambo foram muito maiores do que os encontrados para o tomilho, que é considerada uma planta com elevada atividade antioxidante segundo Almeida (2013).

5.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

Através da técnica de CLAE e da injeção de uma mistura de padrões; foi possível identificar o ácido gálico e catequina utilizando o detector arranjo de diodos no comprimento de onda de 280 nm (canal 10), enquanto que rutina, miricetina e quercetina que absorvem na radiação no comprimento de onda de 320 nm (Canal 2) (Figura 12).

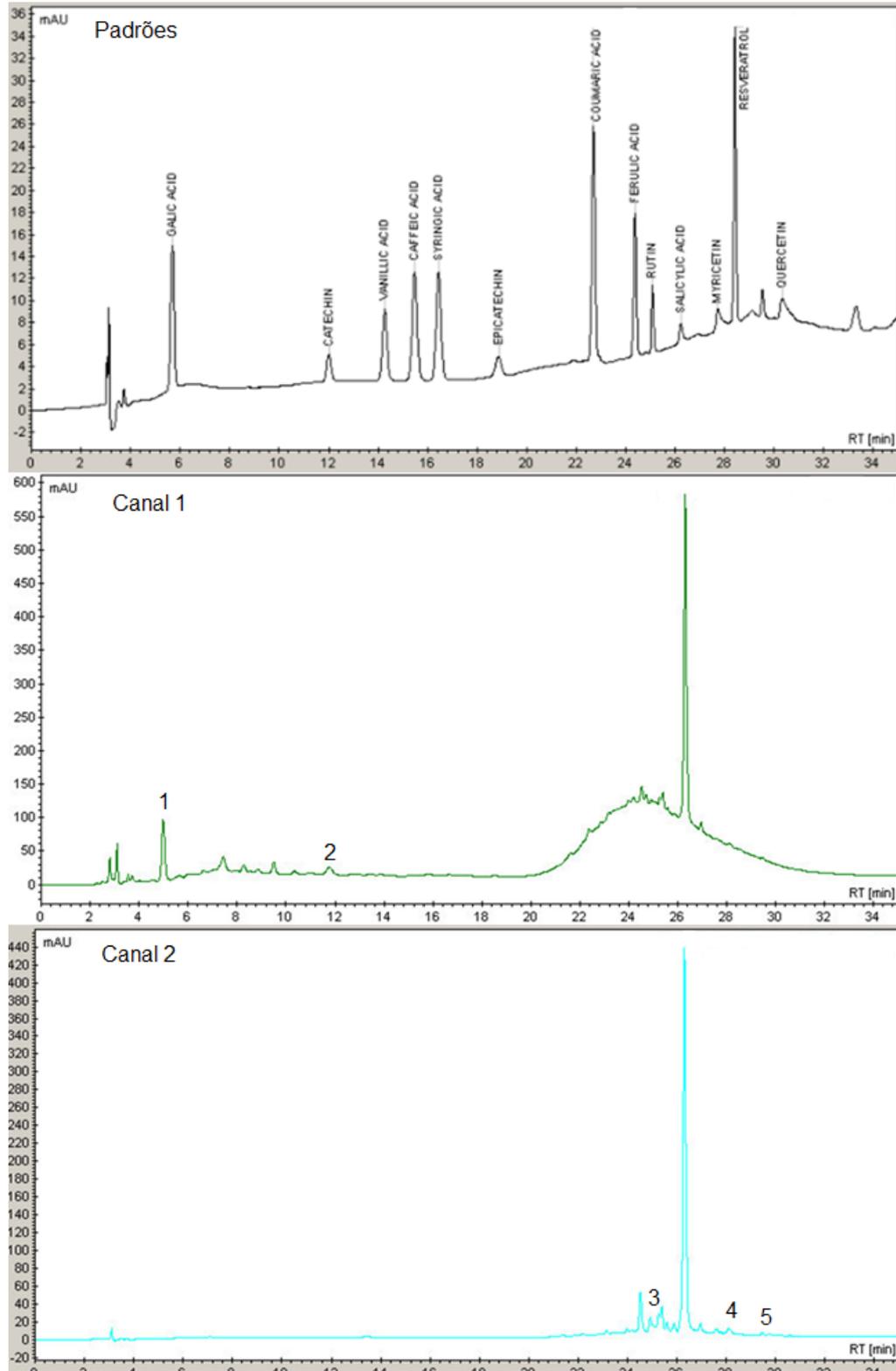


Figura 12 - Cromatogramas dos padrões e das amostras injetadas (1 - ácido gálico; 2 -catequina; 3 - rutina; 4 - mirecetina ; 5 - quercetina).

Fonte: Autoria própria.

Arumugam, et al. (2014) identificou a presença de miricetina em extrato de jambo utilizando CLAE, porém poucos estudos caracterizam os fenólicos presentes

no jambo por CLAE, e isso mostra a necessidade de continuidade nas pesquisas com relação a caracterização do jambo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos para a otimização da extração de compostos bioativos utilizando o planejamento fatorial indicam que o tempo é estatisticamente significativo no processo de extração dos compostos bioativos das folhas de jambo, sendo que a melhor resposta é obtida quando se utiliza o nível superior desta variável. Apesar do variável temperatura não ter se mostrado estatisticamente significativa, os resultados indicam que temperaturas maiores auxiliam no processo de extração dos compostos bioativos.

De acordo com os resultados obtidos utilizando o extrato hidroalcoólico preparado com a melhor condição de extração; quando comparado com outras plantas, o jambo apresenta elevado teor de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante.

A CLAE possibilitou identificar ácido gálico, catequina, rutina, miricetina e quercetina no extrato de folhas do jambo na condição ótima de extração.

REFERÊNCIAS

ABE, Lucile T.; DA MOTA, Vieira; LAJOLO, Franco M.; GENOVESE, Maria, I. Compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de cultivos de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 27, n.2, p. 394-400, 2007.

ALMEIDA, Jacqueline de Florio. **Atividade antioxidante e microencapsulação de extrato etanólico de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2013. 70 f. TCC (Bacharelado em Química) – Coordenação de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V.; AGUIAR, Rosane M.. Métodos para determinação de atividade antioxidante In Vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANDREO, Denise; JORGE, Neuza. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B.Ceppa**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ARAÚJO, Ana Luiza Macedo de. **Polpa de Jambolão (*Syzygium cumini*) desidratada por liofilização e secagem em leito de jorro: caracterização físico química e funcional e impacto da secagem**. 2014. 92 f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2014.

ARBOS, Kettelin Aparecida; STEVANI, Pamela Caroline; CASTANHA, Raquel de Fátima. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, v. 60, n.2, p. 161-165. 2013.

ARUMUGAM, Bavani; MANAHARAN, Thamilvaani; HENG, Chua Kek; KUPPUSAMY, Umah R.; PALANISAMY, Uma D. Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 707-712, 2014.

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

AUGUSTA, Ivanilda Maria; NASCIMENTO, Kamila de Oliveira do; COUTO, Maria Antonieta Peixoto Gimenes; BORGES, Soraia Vilela. Teor de antocianinas totais e atividade antioxidante da Flor de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*). **Higiene Alimentar**, v.27, n. 218/219, p. 1631 -1634, 2013.

AUGUSTA, Ivanilda M.aria; RESENDE, Josane Maria; BORGES, Soraia Vilela; MAIA, Maria Cristina Antun; COUTO, Maria Antonieta Peixoto Gimenes. Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L.) Merryl & Perry). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.4, p. 928-932, 2010.

AUGUSTA, Ivanilda M.aria; RESENDE, Josane Maria; COUTO, Maria Antonieta Peixoto Gimenes; BORGES, Soraia Vilela; A.C. Gouveia. Identificação e quantificação de antocianinas monoméricas na casca de jambo vermelho (*Syzygium malaccense*) por CLAE. In: **SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR**, 4, 2012, Gramado.

AZEVEDO, Rhuanna Rackel de Sá; ALMEIDA, Vanessa Gomes Amaral; SILVA, Egidi Mayara Firmino; SILVA, Alexandre de Lira; GOMES, Nathália Rose da Silva; MATIAS, Thaisa Morgana da Silva; SOUZA, Larissa Isabela Oliveira de; SANTOS, Aldenir Feitosa dos. Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. **Revista Semente**, v. 6, n. 6, p. 240-249, 2011.

BARREIRO, Eliezer J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROS NETO, Benicio de; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 413 p.

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**, New York, v. 239, p. 70-76, 1996.

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

CABRITA, Maria João; RICARDO-DA-SILVA, Jorge; LAUREANO, Olga. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **Anais I Seminário Internacional de Vitivinicultura**. Ensenada, México, 2003.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. (Coord). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2009.

COSTA, Marciano Pires. **Estudo da atividade antioxidante de frutas tropicais exóticas sobre espécies reativas de oxigênio de importância biológica em ensaios modelos.** 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2010.

DE MORAIS, Selene M.; CAVALCANTI, Eveline S. B.; COSTA, Sônia Maria O.; AGUIAR, Liza A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n 1B, p. 315-320, 2009.

DONADIO, L.C.; NACHTIGAL, J. C., SACRAMENTO, C. K. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: Funep, p.279, 1998.

GALLICE, Wellington Cesar. **Caracterização do potencial antioxidante de vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas**

cromatográficas e espectroscópicas multivariadas. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

HAIDA, Kimiyo Shimomura; BARON, Ângela; HAIDA, Karissa Satomi; FACI, Danusa de; HAAS, Jucelaine; SILVA, Fábio José da. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de goiaba e arruda. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 9, n. 28, p. 315-320, 2011.

HAIR, Joseph F.; BLACK, William C.; BABIN, Barry J.; ANDERSON, Rolph E.; TATHAM, Ronald L. **Análise multivariada de dados.** Bookman, 2009.

Jambo vermelho. Disponível em: <<http://multivias.blogspot.com.br/2011/02/via-verde-jambo-uma-frutinha-da-cor-do.html>>. Acesso em 01/12/2014 às 08:53 hrs.

JARDINI, Fernanda Archilla; LIMA, Alessandro de; MENDONÇA, Rita Maria Zucatelli; PINTO, Ricardo José; MANCINI, Dalva Assunção Portari; MANCINI-FILHO, Jorge. Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, L.): Atividade antioxidante e protetora em células MDCK. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 21, n. 4, p. 509-517, 2010.

LORENZI. H; SARTORI, S; BACHER, L. B; LACERDA, M. **Frutas Brasileiras e Exóticas cultivadas(de consumo *in natura*)**. Editora Printed in Brasil. 2006 461p.

MELO, Priscilla S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais.** 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MELO, René Rodrigues de; ARAÚJO, Érika Roberta Silva de; SILVA, Antonio André Lima da; RANDAU, Karina Perrelli; XIMENES, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo. Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 298-302, 2009.

MONARETTO, Tatiana. **Avaliação do potencial antioxidante, extração e quantificação de compostos fenólicos em sucos de uva produzidos no sudoeste do Paraná.** 2013. 48 f. TCC (Bacharelado em Química) – Coordenação de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

OLDONI, Tatiane L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais.** 2010. 163f. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2010.

OLDONI, Tatiane Luiza Cadorin; OLIVEIRA, Sheila C.; ANDOLFATO, Suelen; KARLING, Mariéli; CALEGARI, Matheus A.; SADO, Ricardo Y.; MAIA, Fabiana M. C.; ALENCAR, Severino M.; LIMA, Vanderlei A. 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.

PINELI, Livia de Lacerda de Oliveira. **Qualidade e potencial antioxidante *in vitro* de morangos *in natura* e submetidos a processamentos.** 2009.222 f. Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PINTO, Angelo C.; SILVA, Dulce Helena Siqueira; BOLZANI, Vanderlan da Silva; LOPES, Norberto Peprine; EPIFANIO, Rosângela de Almeida. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PORGAH, Esra; BÜYÜKTUNCEL, Ebru. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, Essex, v. 45, p. 145–154, 2012.

PUPO, Mônica Tallarico; GALLO, Margareth Borges Coutinho; VIEIRA, Paulo Cezar. *Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RUFINO, Maria S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S.; MORAIS, Selene M.; SAMPAIO, Caroline G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico, 125).

RUFINO, Maria do Socorro M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S. de; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio; MANCINI-FILHO, Jorge. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

SHAIKI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and Applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 281-319.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, Andrina Guimarães; LIMA, Renato Abreu; SILVA, Leidiléia Pereira da; SOUZA, Ana Cristina Ramos de. Uso, conservação e diversidade de plantas aromáticas, condimentares e medicinais para fins medicinais na comunidade Vila Princesa, Porto Velho-RO. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 2, p. 21-35, 2011.

SINGLETON, Vernon. L.; ORTHOFER, Rudolf.; LAMUELA, Rosa. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUSA, Raquel M. F.; LIRA, Camila S.; RODRIGUES, Amanda O.; MORAIS, Sérgio A. L.; QUEIROZ, Carla R. A. A.; CHANG, Roberto; AQUINO, Francisco J. T.; MUÑOZ, Rodrigo A. A.; OLIVEIRA, Alberto de. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pronóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos in vitro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 448-457, 2014.

STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation e detection methods for phenolic acid and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v. 30, n. 18, p. 3268 - 3295, 2007.

VEBER, J., PETRINI, L., ANDRADE, L., & SIVIERO, J. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista brasileira plantas medicinais**, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2015.

VEDANA, Maria Isabel Simczak. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-237, 2006.

ZAMBELLI, Ariadna Ribeiro; AGUIAR, Liza Araújo; CUNHA, Arcelina Pacheco; VIEIRA, Mariano George Sousa; CAVALCANTI, Eveline Solon Barreira; MORAIS,

Selene Maia de. Avaliação do potencial antioxidante e análise do teor de taninos totais de *Syzygium malaccense*. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**, Florianópolis, 2006.