

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

ULLY ETELVINA COSTA MARTINS

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE PLANTAS UTILIZADAS NA
MEDICINA POPULAR BRASILEIRA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2016**



Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Curso Bacharelado em Química Industrial
Departamento de Química - COQUI



ULLY ETELVINA COSTA MARTINS

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE FENÓLICOS E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE PLANTAS
UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR BRASILEIRA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO
2016

ULLY ETELVINA COSTA MARTINS

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE FENÓLICOS E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE PLANTAS
UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR BRASILEIRA**

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.

Orientadora: Prof. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

PATO BRANCO
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Determinação da composição de fenólicos e atividade antioxidante de espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira**, foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 12.2.2016-B de 2016.

Fizeram parte da banca os professores.

Tatiane L. Cadorin Oldoni
Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Aline Savi
Aline Savi

Matheus Augusto Calegari
Matheus Augusto Calegari

AGRADECIMENTOS

Obrigado, é a palavra que se usa quando alguém se sente agradecido, perante alguma situação cotidiana.

Serei imensamente e eternamente grata àqueles que de alguma forma, me ajudaram a conquistar um dos principais objetivos de se tornar um Bacharel em Química. Agradeço aos meus pais, que me deram todo apoio durante o tempo em que permaneci estudando em Pato Branco, em especial minha mãe, por ter me dado todo apoio emocional de que precisei durante os períodos mais árduos que vivi. Agradeço às minhas irmãs, Iasmim e Carol, por terem sido ombros amigos, e companheiras nas horas em que precisei me desconectar. Agradeço a todos os familiares, que mesmo de longe estiveram torcendo por mim, e me dando apoio de algum modo.

Agradeço aos mestres, por toda inspiração, todo aprendizado, todas as cobranças devidamente colocadas, cada um de vocês é um pouco daquilo que quero ver no espelho a partir de agora.

Aos amigos que conquistei, quero deixar um enorme abraço, e dizer que vocês foram anjos que não me deixaram desistir, e me proporcionaram uma graduação mais gostosa, mais divertida, mais alegre.

A maior gratidão e o maior agradecimento, vai para àqueles que já se foram, mas que foram meu combustível e minha motivação pra continuar, ao meu irmão Glaicon e minha bisa querida.

RESUMO

Antioxidantes são espécies que em baixa concentração, são capazes de inibir ou retardar a atividade dos radicais livres. Nesse sentido, a busca por espécies antioxidantes naturais tem crescido nos últimos anos, no sentido de substituir os compostos sintéticos que podem ser tóxicos e extremamente prejudiciais ao organismo humano. Neste trabalho foram analisados o teor de compostos fenólicos, avaliadas as atividades antioxidantes pelos métodos do DPPH, ABTS e FRAP, bem avaliação do perfil cromatográfico e caracterização bromatológica das espécies *Cordia salicifolia*, *Aristolochia cymbifera*, *Polygonum acre* e *Echinodorus grandiflorus*. As espécies *C. salicifolia* e *A. cymbifera*, apresentaram os melhores teores de compostos fenólicos, bem como o melhor resultado pra atividade antioxidante para os parâmetros ABTS e FRAP. Para a espécie *P. acre*, foram identificados ácido gálico, catequina, ácido ferrúlico e rutina de acordo com o perfil cromatográfico. Os parâmetros bromatológicos foram realizados e os melhores resultados foram obtidos para a espécie *Cordia salicifolia*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1 RADICAIS LIVRES.....	10
3.2 ANTIOXIDANTES.....	12
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	14
3.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ...	16
3.4.1 Método de avaliação antioxidante pela redução do radical DPPH•.	17
3.4.2 Método de avaliação antioxidante pela redução do cátion radical ABTS ⁺ •	18
3.4.3 Método de avaliação antioxidante pela redução do Fe ³⁺ a Fe ²⁺	19
3.4.4 Método de determinação de compostos fenólicos pela redução do reagente Folin-Ciocalteu	20
3.5 ESPÉCIES DE ESTUDO.....	20
3.6 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISES BROMATOLÓGICAS	22
3.6.1 CINZAS	23
3.6.2 LIPÍDIOS	23
3.6.3 PROTEÍNAS.....	24
3.6.4 FIBRAS BRUTAS.....	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	26
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	26

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•	26
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS+•	27
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP	27
4.6 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO REAGENTE FOLIN-CIOCALTEAU	28
4.7 CINZAS	28
4.8 LIPÍDIOS	29
4.9 PROTEÍNAS.....	29
4.10 FIBRA BRUTA.....	30
4.11 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	30
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .	32
5.1.1 <i>Cordia salicifolia</i>	32
5.1.2 <i>Aristolochia cymbifera</i>	33
5.1.3 <i>Polygonum acre</i>	33
5.1.4 <i>Echinodorus grandiflorus</i>	34
5.2.3 <i>Cordia salicifolia</i>	34
5.2.2 <i>Aristolochia cymbifera</i>	35
5.2.3 <i>Polygonum acre</i>	36
5.2.4 <i>Echinodorus grandiflorus</i>	36
5.2.5 Quantificação dos compostos identificados	37
5.3 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, o homem busca na natureza meios de melhorar sua qualidade de vida. O uso de plantas como meios de recuperação da saúde ou tratamento de doenças e feridas é uma prática tão antiga quanto a civilização humana. O conhecimento popular no uso das plantas medicinais evoluiu com o passar dos anos, e os estudos referentes às propriedades químicas e farmacológicas que determinadas espécies podem apresentar tem ganhado destaque nas últimas décadas (LORENZI; MATOS, 2008; MATIAS et al., 2015). O Brasil é um país rico em plantas medicinais aplicadas para os mais diversos fins, como diuréticos, antiinflamatórios, antissépticos, anticarcinogênicos, entre outros.

A busca por antioxidantes naturais tem despertado o interesse de parte de pesquisadores como forma de substituir os antioxidantes sintéticos, que apresentam custo elevado, além de em determinadas quantidades poderem ser considerados tóxicos (SINGH; KUMARI, 2015). Dessa forma, a determinação de antioxidantes e compostos fenólicos, vem sendo realizada principalmente em folhas, flores e frutos de diversas espécies.

O processo de oxidação faz parte do metabolismo do corpo humano, porém essa ação pode causar diversas consequências negativas às células e tecidos que compõem o organismo. Nas células humanas o metabolismo do oxigênio leva a produção de radicais como o íon superóxido, radicais hidroxilas, peroxila, alcóxila, óxido nítrico e dióxido de nitrogênio, e a eles são atribuídas as reações em cadeia que provocam efeitos adversos ao organismo (ROESLER et al., 2007; SKOOG et al., 2011).

Pela definição de Young e Woodside (2000), “Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie molecular capaz de existência independente, que contém um elétron não pareado em um orbital atômico”. A existência de um elétron desemparelhado em sua estrutura, é o que confere aos radicais livres algumas propriedades particulares, pois têm a capacidade de doar ou extrair um elétron de determinada molécula, sendo moléculas extremamente reativas (YOUNG; WOODSIDE, 2000).

Os antioxidantes são espécies que atuam em baixas concentrações comparado as concentrações do substrato, e que podem reduzir a influência dos radicais livres no organismo, pois retardam ou inibem a oxidação de um determinado substrato, evitando as reações em cadeia típicas de espécies radicalares (SOUSA et al., 2007). Os compostos fenólicos são um grupo seletivo de antioxidantes que se ajustam a classe de fenóis simples, e a atividade antioxidante destes compostos está relacionada a sua estrutura química e propriedades redutoras, os intermediários formados pelos compostos fenólicos possuem elevada estabilidade devido a ressonância do anel aromático (ROESLER et al., 2007).

É razoável afirmar que um equilíbrio deve ser estabelecido entre radicais livres e as defesas antioxidantes para que haja um bom funcionamento do corpo humano. Quando este equilíbrio não é atingido e tende à formação de radicais, diz-se que o organismo está em stress oxidativo, nessa situação, os radicais podem oxidar lipídios, proteínas e DNA, modificando essas moléculas e não raramente inibindo a sua função original (FERREIRA; ABREU, 2007). Há evidências de que a formação excessiva de radicais e, conseqüentemente, o stress oxidativo podem causar diversas doenças como aterosclerose, doenças cardiovasculares, envelhecimento, diabetes mellitus, imunossupressão, doenças neurodegenerativas entre outras (YOUNG; WOODSIDE, 2000).

O estudo de antioxidantes é crescente nos últimos anos, devido aos efeitos benéficos proporcionados por essas espécies ao organismo humano, como também a prevenção das diversas doenças já citadas. Por serem compostos facilmente oxidáveis, os antioxidantes evitam a oxidação de outras moléculas importantes. Os antioxidantes podem ser de origem endógena ou podem ser adquiridos com a ingestão de determinados alimentos que possuem esses compostos, um bom exemplo são frutas das colorações vermelha e azul que são comprovadas fontes de compostos fenólicos (OLIVEIRA, 2011; SOUSA et al., 2007). Dentro deste contexto, o principal objetivo do trabalho consiste em avaliar a atividade antioxidante das plantas em questão, bem como realizar a caracterização bromatológica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais e determinar composição nutricional dos extratos brutos das folhas das espécies, *Cordia salicifolia* (folhas), *Echinodorus gradiflorus* (folhas) e *Polygonum acre* (parte aérea) e *Aristolochia cymbifera* (cipó), bem como realizar a caracterização bromatológica das espécies, a partir da matéria seca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato bruto das espécies, *Aristolochiacymbifera*, *Cordiasalicifolia*, *Echinodorusgradiflorus* e *Polygonum acre*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos de sequestro dos radicais 2,2' –difênil-1-picrilidrazila (DPPH) e 2,2' –azo-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS);
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelo método de redução do reagente Folin-Ciocalteu e Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP);
- Realizar análises bromatológicas de cinzas, proteínas, lipídios e fibras brutas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Durante muitos séculos os vegetais eram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. Com o incremento da química farmacêutica no século XIX, as plantas começaram a ser utilizadas para o desenvolvimento de medicamentos e seus efeitos benéficos evidenciados para a saúde humana. As propriedades que algumas plantas possuem, podem garantir a prevenção e tratamento de algumas doenças, podendo agir como anti-inflamatórios, analgésicos, relaxantes musculares, etc (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Dentre as infinitas propriedades encontradas em plantas, uma delas é a capacidade de atuar como inibidor da formação de radicais livres no organismo.

3.1 RADICAIS LIVRES

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua estrutura, esta característica garante a esses átomos e moléculas uma alta reatividade com a maior parte das espécies químicas, sendo orgânicos ou inorgânicos, com carga positiva, negativa ou neutros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FERREIRA; ABREU, 2007; WEZEL, 2012). No organismo humano, os radicais livres são formados pelo metabolismo oxidativo celular, sobretudo, na mitocôndria durante o processo de respiração e atividade enzimática. As espécies radicais formadas podem ser derivadas de oxigênio ou nitrogênio sendo denominadas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's), e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN's) respectivamente (FERREIRA; ABREU, 2007; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Os radicais livres, atuam como sinalizadores de transdução, transcrição de gene e regulação da atividade da guanilato-ciclase. Os níveis fisiológicos de radicais óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) são extremamente importantes para regulação da adesão de leucócitos, agregação de plaquetas, angiogênese de trombose, tônus musculares, dentre outras funções (FANG; YANG; WU, 2002). Entretanto, o excesso na produção desses radicais pode causar efeitos adversos, visto que, nessas condições, pode ocorrer a modificação ou degradação de compostos bioquímicos celulares, como DNA e RNA, proteínas, carboidratos e lipídios (OLIVEIRA, 2011; SINGH; KUMARI, 2015; SOUSA et al., 2007). Acumulados, os radicais livres, podem causar perda funcional das células e morte celular. Dessa forma, esses radicais têm sido associados ao desenvolvimento de diversas patologias, doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce, distúrbios neurodegenerativos, doenças inflamatórias do pulmão, cânceres, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais, etc (OLIVEIRA, 2011; SOUSA et al., 2007).

O oxigênio molecular está presente no organismo em seu estado fundamental, devido sua forte tendência em receber um elétron, a partir dele se inicia um processo de formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hidroperoxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$). Dentre as espécies derivadas de nitrogênio, destacam-se compostos moleculares ou iônicos como óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^{1-}), nitratos (NO_3^{1-}), peroxinitritos (ONOO^{1-}) e radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; OLIVEIRA, 2011; SOUSA et al., 2007).

Em geral, todos os componentes das células estão susceptíveis a ação de ERO's, entretanto, a membrana celular é a mais afetada pela reação com radicais livres (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Isso acontece por que a membrana celular é formada por bicamadas lipídicas, basicamente ácidos graxos insaturados, nesses compostos, os hidrogênios das cadeias hidrocarbonadas não estão ligados com a mesma energia, portanto, o processo de oxidação ocorre mais facilmente que em ácidos graxos saturados (WEZEL, 2012).

A peroxidação lipídica se inicia em geral com a extração de um átomo de hidrogênio da cadeia polinsaturada (LH) da membrana celular através da ação de um ERO que pode ser hidroxila, peróxido de hidrogênio ou alcóxila ($\text{LO}\cdot$), formando-se o radical lipídico ($\text{L}\cdot$), a reação se segue com a adição de uma molécula de oxigênio formando o radical peróxila ($\text{LOO}\cdot$), este sequestra outro hidrogênio da cadeia de

ácido graxo polinsaturada formando novamente o radical lipídico ($L\cdot$), o término da reação em cadeia acontece quando os radicais peroxila e lipídico ($LOO\cdot$ e $L\cdot$) se propagam até destruírem a si próprios (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FERREIRA; ABREU, 2007). As reações envolvidas no processo de peroxidação lipídica estão descritas na Figura 1.

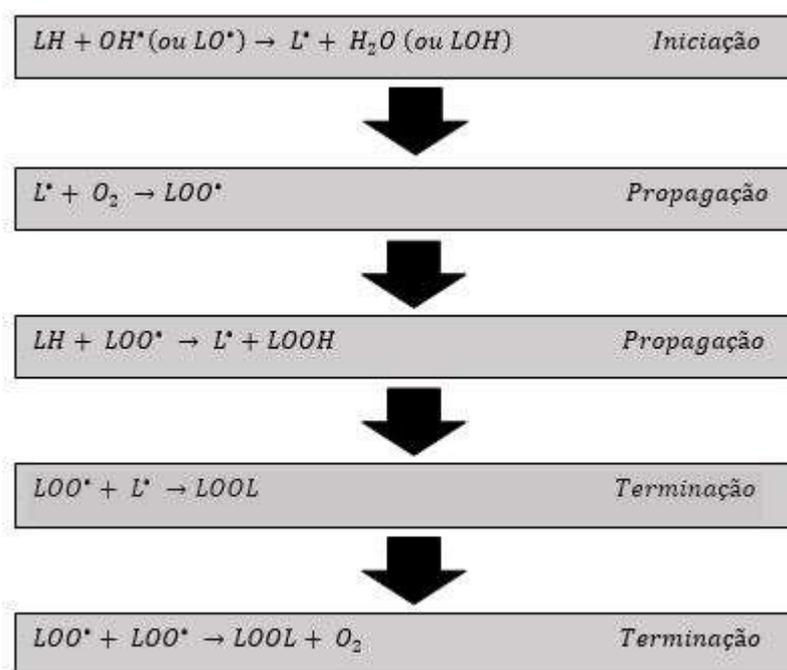


Figura 1: Etapas da peroxidação lipídica

Fonte: Autoria própria

As substâncias ERO/ERN são formadas continuamente no organismo por um processo natural, o metabolismo oxidativo, sendo assim, as próprias células possuem mecanismos de atenuar os efeitos agressores dos radicais livres (OLIVEIRA, 2011; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; SOUSA et al., 2007).

3.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos que atuam em uma baixa concentração em relação ao substrato oxidável e inibem ou retardam eficientemente o processo de

oxidação das moléculas, evitando assim, a formação de radicais livres (SINGH; KUMARI, 2015; SOUSA et al., 2007; WEZEL, 2012).

Os compostos antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos ou não enzimáticos. Entre os enzimáticos estão incluídas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationaperoxidase (GPx).Essas enzimas evitam que radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (que apesar de não ser um radical, é um metabólito que participa da reação de formação de hidroxilas) se acumulem e formem radicais hidroxilas (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; WEZEL, 2012).

A classe dos antioxidantes não enzimáticos pode ser subdividida em antioxidantes naturais ou sintéticos (WEZEL, 2012). Os sintéticos são desenvolvidos pela indústria química, sendo comumente utilizados nas indústrias de corantes, óleos e derivados lipídicos. Desta categoria, os mais comuns são butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT) propilgalato (PG) e *tert*-butilidroquinona (TBHQ), (Figura 2). Entretanto, há evidências de que muitos antioxidantes sintéticos são tóxicos e causam diversos malefícios ao organismo, portanto, um nível de ingestão diária foi estabelecido com uma quantidade que não resulte em danos à saúde (OLIVEIRA, 2011; WEZEL, 2012).

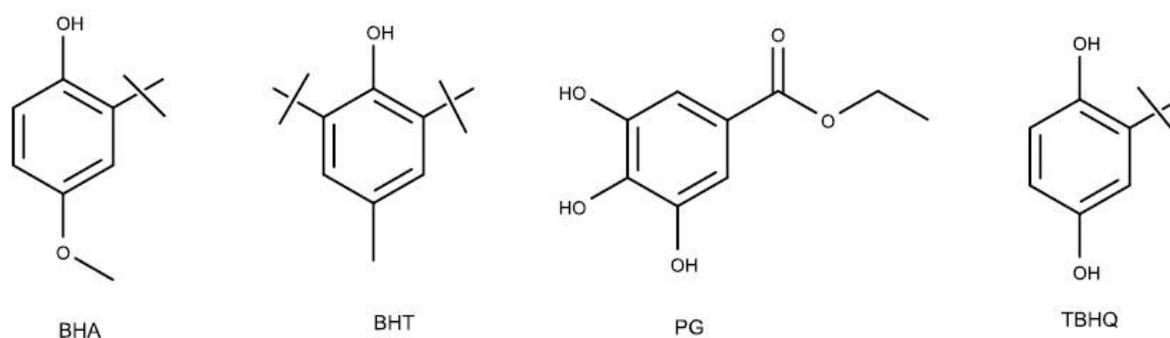


Figura 2: Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos

Fonte: Autoria própria

Os antioxidantes naturais estão presentes na composição de alimentos como folhas e frutos, e no metabolismo do corpo humano (OLIVEIRA, 2011; WEZEL, 2012). Devido a toxicidade de antioxidantes sintéticos, é de extrema importância a busca por espécies antioxidantes naturais, dentre estes, destacam-se tocoferóis (Vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C), vitamina A, polifenóis, selênio, e carotenoides (SOUSA et al., 2007). São conhecidas diversas classes de compostos

antioxidantes, porém, o destaque dos últimos anos são os compostos fenólicos, pois são capazes de inibir a peroxidação lipídica (FERREIRA; ABREU, 2007).

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

A classe dos compostos fenólicos é o grupo de substâncias mais numeroso no reino vegetal, em geral, são substâncias que possuem em sua estrutura um ou mais anéis aromáticos ligados a grupos hidroxila (-OH), dentro desta definição estão incluídos também os polifenóis (WEZEL, 2012). As propriedades antioxidantes que os compostos fenólicos revelam, são devido a sua capacidade de retirar oxigênio derivado de radicais livres e pela doação de um hidrogênio ou elétron para estabilizar o radical. A ação ocorre tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo formando intermediários relativamente estáveis devido a ressonância do anel aromático (SINGH; KUMARI, 2015; SOUSA et al., 2007). Os compostos fenólicos podem ser classificados em flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos).

A estrutura básica dos flavonoides consiste em um núcleo flavano com 15 carbonos arranjados em três anéis conforme mostra a Figura 3 (WEZEL, 2012).

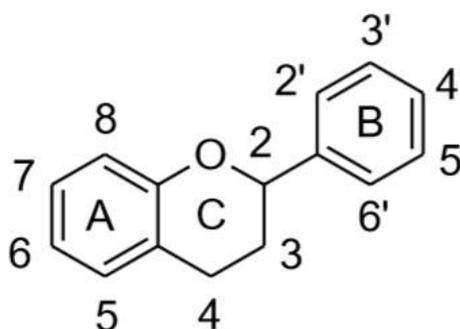


Figura 3: Estrutura química de flavonoides

Fonte: (OLIVEIRA, 2011)

Os flavonoides são encontrados principalmente em café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e especialmente, chá, mas também podem ser encontrados em sementes, grãos, nozes, condimentos. Dentro da classe dos flavonoides, os principais compostos são flavonas, flavononas, flavonóis, catequinas, antocianinas, e as isoflavonas (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA, 2011). A quercetina (Figura 4) é o flavonoide mais frequentemente encontrado nos alimentos, a presença de cinco grupos hidroxila confere a esse flavonoide um comportamento antirradicalar significativo, devido a esta propriedade é o polifenol mais estudado atualmente (LOPES et al., 2000; OLIVEIRA, 2011).

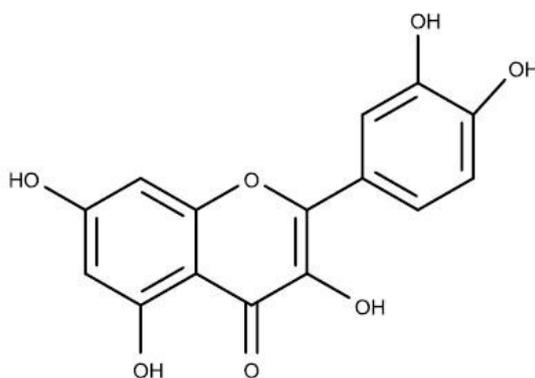


Figura 4: Estrutura química da quercetina

Fonte: Autoria própria

Os compostos não-flavonoides também chamados de ácidos fenólicos, geralmente são fenóis simples e derivados de ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. Sua estrutura é basicamente composta de um anel aromático (Figura 5), onde estão ligados oxidrilas caracterizando a função fenólica (SILVA et al., 2010; WEZEL, 2012). Outras funções orgânicas podem estar ligadas ao anel sem interferência na função fenólica do composto. Os principais compostos não-flavonoides encontrados são, ácido ceféico, ácido cumárico, ácido felúrico, ácido salicílico, ácido gálico, ácido elágico, ácido protocatéico e ácido vanílico, presentes em alimentos como kiwi, berinjela, ameixa, framboesa, groselha preta, morango, amora preta, laranja, limão, tangerina entre outros (SILVA et al., 2010; WEZEL, 2012).

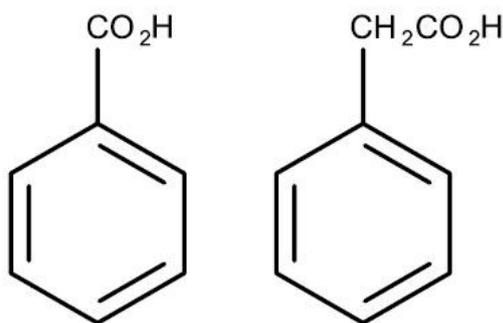


Figura 5: Moléculas de ácido hidroxicinâmico e ácido hidroxibenzóico

Fonte: autoria própria

3.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Biologicamente, as ERO'S, ERN's e radicais livres têm sua importância para o bom funcionamento do organismo. O excesso de radicais livres em relação aos antioxidantes pode provocar lesões celulares e desencadear uma série de deficiências funcionais que tem por consequência o aparecimento de diversas doenças. A situação ideal é atingida quando os radicais livres e antioxidantes estão em equilíbrio, prevenindo o estresse oxidativo. As justificativas citadas anteriormente são os principais propulsores da crescente pesquisa relacionada às reações de radicais livres e capacidade de algumas substâncias em inativá-los ou retardar seu funcionamento (OLIVEIRA, 2011).

Entretanto, um composto pode apresentar atividade antirradicalar *in vitro* e não apresentar a mesma atividade *in vivo*, sendo necessário conhecer a fonte do estresse oxidativo, o mecanismo e o alvo. A escolha do método para avaliar a atividade antioxidante deve considerar a escolha de radicais estáveis de fácil manuseio, simplicidade do método e reprodutibilidade do resultado (OLIVEIRA, 2011). Dentro desses critérios alguns métodos são comumente utilizados para determinação da atividade antioxidante, como o método de redução do radical DPPH• (2,2' –difetil-picril-hidrazila), sequestro do radical ABTS (2,2' –azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) e o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidante Power).

3.4.1 Método de avaliação antioxidante pela redução do radical DPPH•

O método de sequestro do radical DPPH• consiste na avaliação da capacidade de um agente antioxidante reduzir a espécie DPPH•. O radical 2,2'-difenil-picril-hidrazila (DPPH•) é estável e de cor púrpura e possui uma banda de absorção máxima característica em 515 nm. Quando se reage o DPPH• com uma espécie antioxidante, o DPPH• é reduzido para difenil-picril-hidrazila e ocorre a alteração da cor de púrpura para amarelo e a extinção da banda de absorção característica, como mostra a Figura 6 (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; OLIVEIRA, 2011).

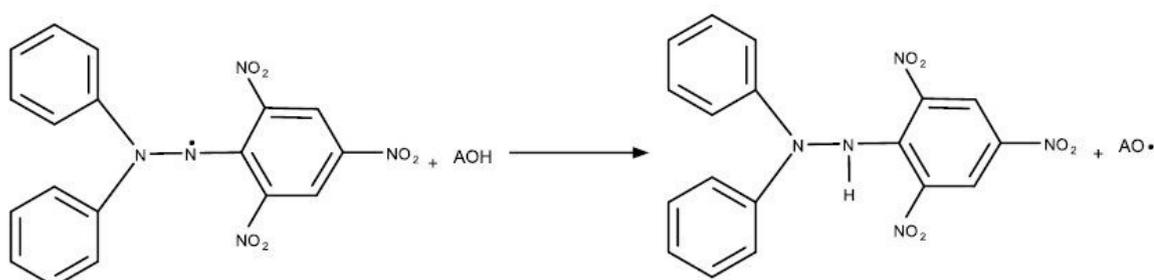


Figura 6: Reação do radical DPPH com uma espécie antioxidante

Fonte: A autoria própria

O processo de redução pode ser monitorado acompanhando-se o déficit da absorbância. Determina-se a partir dos resultados obtidos a porcentagem da atividade antioxidante (%AA) que corresponde a quantidade do radical DPPH• consumida na reação, a quantidade de antioxidante fundamental para redução da concentração de DPPH• em 50% é chamada concentração eficiente (CE₅₀), ou concentração inibitória (CI₅₀).

Outra alternativa para avaliar os resultados é determinar a porcentagem de DPPH• restante no meio reacional (SOUSA et al., 2007). A maneira de se expressar o resultado depende estritamente da concentração inicial de DPPH•, uma das desvantagens de se usar este método é que os radicais de importância biológica

reagem fortemente com os radicais peroxila, em geral os compostos antioxidantes que possuem alta reatividade com radicais como peroxila não reagem ou possuem reatividade muito baixa com o DPPH• em função do seu impedimento estérico (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; OLIVEIRA, 2011; SOUSA et al., 2007).

3.4.2 Método de avaliação antioxidante pela redução do cátion radical ABTS⁺

A geração do cátion radical 2,2' –azo-bis(3-etilbenzoatiazolona-6-sulfonato) o ABTS, pela reação de oxidação com o persulfato de potássio ou dióxido de manganês, tem sido largamente utilizado para a avaliação da atividade antioxidante de uma solução ou de um composto puro (RE et al., 1999). A capacidade antirradicalar é definida de acordo com a porcentagem de inibição na formação do ABTS, monitorada espectrofotometricamente com máximos de absorção de 415, 645, 734, e 815 nm, utilizando-se o trolox como antioxidante padrão (OLIVEIRA, 2011). Este método é muito empregado devido a sua facilidade de operação e obtenção de resultados, o ABTS é solúvel em meio aquoso e orgânico, isso torna ele capaz de ser utilizado em diferentes meios de avaliação da atividade antioxidante para soluções hidrofílicas e lipofílicas (OLIVEIRA, 2011). A reação que descreve o método do ABTS é apresentada na Figura 7.

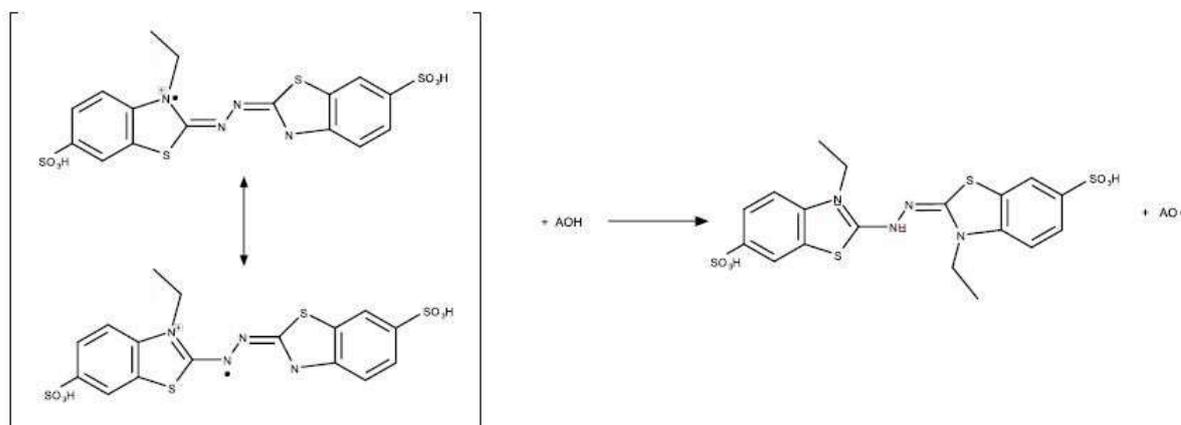


Figura 7: Reação do radical ABTS com antioxidante padrão trolox

Fonte: Autoria própria

3.4.3 Método de avaliação antioxidante pela redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}

Um método para avaliar a atividade antioxidante amplamente utilizado atualmente é o FRAP, esse processo mede a habilidade de redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a (Fe^{2+} -TPTZ) ferroso-tripiridiltriazina por antioxidantes plasmáticos a baixos valores de pH. Após a redução do complexo, este apresenta uma cor azul intensa e absorvância máxima característica de 593 nm, a capacidade antioxidante é monitorada pela capacidade de redução do ferro (III) a ferro (II), como observado na Figura 8. Entretanto, existem algumas limitações do método, afinal nem toda substância capaz de reduzir o ferro (III) é antioxidante, e nem todo antioxidante tem este potencial de redução (BENZIE; STRAIN, 1996).

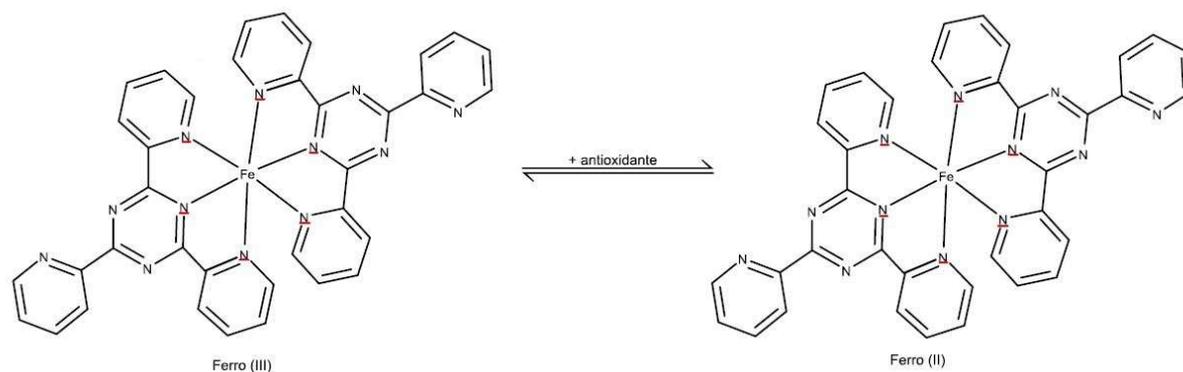


Figura 8: Redução do Fe (III) à Fe (II)

Fonte: Autoria própria

3.4.4 Método de determinação de compostos fenólicos pela redução do reagente Folin-Ciocalteu

Os métodos existentes para análise de compostos fenólicos podem ser separados em determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual ou quantificação de um grupo ou classe de fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007). Diversos métodos espectrofotométricos baseados em diferentes princípios têm sido desenvolvidos para análise de compostos fenólicos, o mais utilizado atualmente tem sido o método de redução do reagente Folin-Ciocalteu devido a sua sensibilidade a redução (ANGELO; JORGE, 2007; SOUSA et al., 2007). O reagente Folin-Ciocalteu é formado por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, nestes compostos o molibdênio e o tungstênio se encontram no estado de oxidação +6, na presença de compostos fenólicos essas substâncias são reduzidas a um estado de oxidação entre +5 e +6 apresentando coloração azul característica que permite a determinação da concentração dos agentes redutores, de acordo com a Figura 9 (SOUSA et al., 2007).

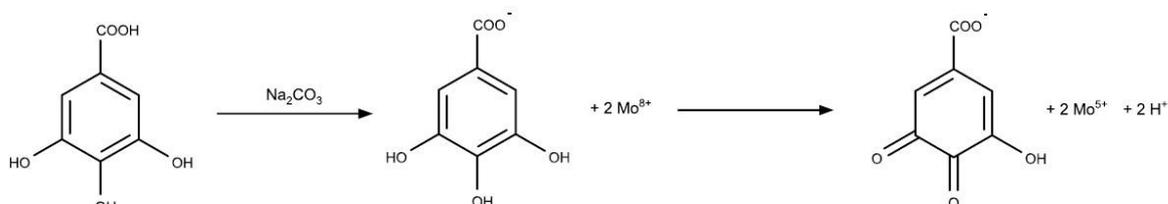


Figura 9: Redução do molibdênio para o método de Folin-Ciocalteu

Fonte: Autoria própria

3.5 ESPÉCIES DE ESTUDO

A utilização das plantas medicinais, no Brasil, se iniciou com as tribos indígenas, se estendendo à população europeia recém chegada. Logo após, os africanos contribuíram para a medicina popular a partir do uso de plantas trazidas da

África (ALVES; SILVA, 2003; LORENZI; MATOS, 2008). O Brasil é um país rico em plantas medicinais, e são aplicadas para os mais diversos fins, como diuréticos, anti-inflamatórios, antissépticos, anticarcinogênicos, entre outros.

A *Cordia salicifolia* (sin. *Cordia ecalyculata*), é uma árvore nativa brasileira, ocorrendo desde a região Nordeste até o Sul do país. É conhecida popularmente como café-do-mato, mas podem haver variações de uma região para outra. Os frutos dessa espécie são bagas globulosas vermelhas, muito semelhante ao café. Utilizada na medicina popular e até mesmo comercializada na forma de extratos. Pode ser empregada como tônico cardíaco, diurético, redutor de apetite. Estudos comprovam seu efeito na redução da penetração do vírus tipo da Herpes, e ação tóxica contra células cancerígenas (HAYASHI et al., 1990).

A espécie *Aristolochia cymbifera* é uma trepadeira herbácea nativa do Brasil, encontrada principalmente nas regiões Sul e Sudeste se estendendo até a Bahia. Dependendo da região em que é encontrada, o nome popular pode variar, Cipó-mil-homem é um dos nomes mais comuns (LORENZI; MATOS, 2008). Geralmente florescem em clima quente, o fruto tem formato de cápsula, exala um cheiro forte, e possui gosto amargo. É amplamente utilizada na medicina popular, sendo considerada diurética, sedativa, estomáquica, antisséptica, diaforética. É aplicada para febres, dispepsia, asma, diarreia, convulsões, caspa, males do estômago, entre outros sintomas (CORRÊA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1994; LORENZI; MATOS, 2008).

A *Polygonum acre* (sin: *Polygonum hydropiperoides*), é uma planta aquática ocorrente nas regiões sul e sudeste do Brasil de nome popular, erva-de-bicho, acataia, pimenta d'água etc. Na medicina popular, é empregada como adstringente, estimulante, diurética, vermífuga, entre outros (LORENZI; MATOS, 2008).

A *Echinodorus grandiflorus* é uma espécie de erva aquática nativa de terrenos brejosos e ácidos por todo o continente Americano, inclusive no Brasil. Na cultura popular, é conhecida como chapéu-de-couro (CORRÊA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1994). Seu uso na medicina popular data séculos, sendo aplicada tanto na forma de chás, como na indústria farmacêutica de fitoterápicos. Toda as partes da planta podem ser utilizadas, sendo empregada em tratamento da sífilis, doenças de pele, afecções renais, reumatismo, afecções da garganta, estomatite, gengivite, gota, entre outros sintomas (LORENZI; MATOS, 2008).

As plantas descritas anteriormente, são visualizadas na Figura 10.

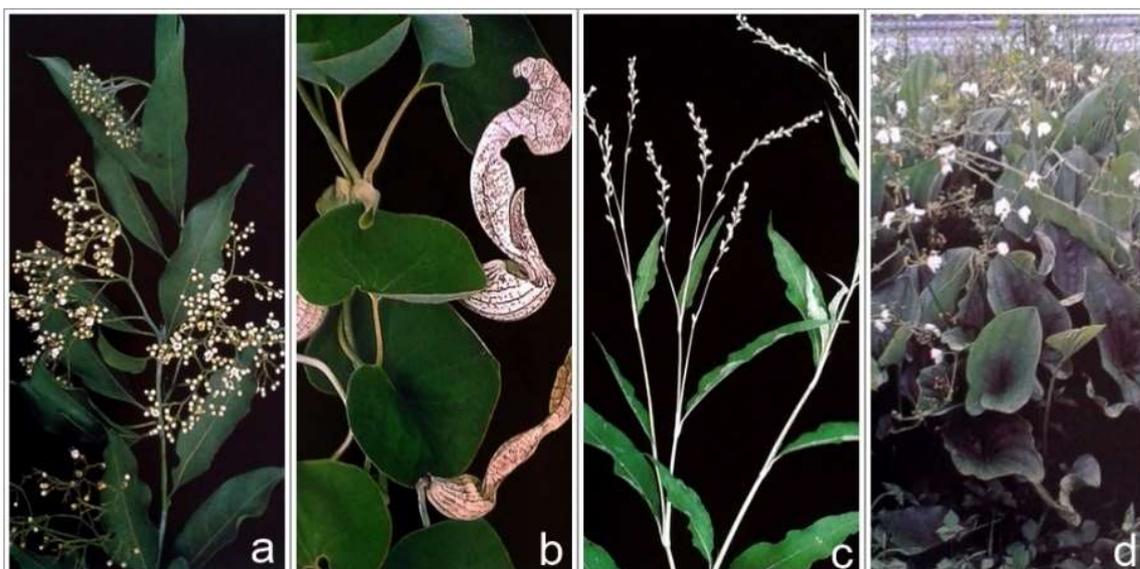


Figura 10: Plantas de estudo: a) *Cordia salicifolia* b) *Aristolochia cymbifera* c) *Polygonum acre* d) *Echinodorus grandiflorus*

Fonte: (LORENZI; MATOS. 2008)

3.6 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

A Bromatologia se trata de uma ciência que estuda a composição química dos alimentos, nesse sentido, desempenha um papel fundamental na avaliação da qualidade e segurança de um determinado alimento (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008). O objetivo de se analisar um alimento, é, em geral, determinar um ou mais componentes específicos de sua estrutura.

Para se determinar um componente, deve-se realizar a medida de alguma propriedade física da amostra em questão, como por exemplo, massa, volume, absorção de radiação, potencial elétrico, etc (CECCHI, 2003).

A fim de determinar a composição de um alimento específico, diversos métodos analíticos podem ser utilizados. Existem principalmente dois tipos básicos de métodos para se analisar a composição de alimentos, métodos convencionais, onde se usam apenas vidrarias e reagentes, geralmente são utilizados métodos de gravimetria ou volumetria, ou métodos instrumentais, em que são usados equipamentos com alto grau de sofisticação (CECCHI, 2003).

3.6.1 CINZAS

As cinzas são resíduos de alimentos incinerados a uma temperatura próxima de 500°C, onde a matéria orgânica é completamente destruída, restando apenas matéria mineral. O resíduo por incineração, apresenta geralmente cátions como cálcio, potássio, sódio, magnésio, ferro, cobre, cobalto e alumínio, e ânions, sulfato, cloreto, silicato, fosfato, entre outros. A incineração da amostra pode ser realizada em bico de Bunsen, ou em mufla (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008; RODRIGUES, 2010). Após a incineração as cinzas obtidas não têm necessariamente a mesma composição que a matéria mineral presente no alimento anteriormente, isso ocorre por que alguns constituintes da amostra podem interagir entre si como também volatilizar, causando perdas durante o processo (CECCHI, 2003).

3.6.2 LIPÍDIOS

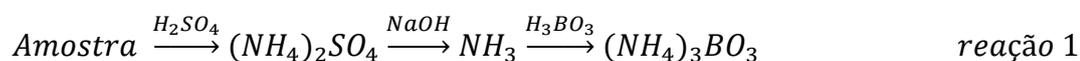
As gorduras são elementos que podem ter origem animal ou vegetal, são compostos onde se predomina ésteres e ácidos graxos superiores. Os lipídios são compostos orgânicos altamente energéticos, influenciando diretamente no valor nutricional do alimento, desempenham nos organismos funções importantes como o transporte de vitaminas lipossolúveis. Podem ser classificados em simples, compostos ou derivados. Os lipídios não possuem um valor alimentar constante, portanto, estima-se que a cada um grama de gordura, são produzidos 9,35 kcal de energia bruta, aproximadamente 9 kcal de energia metabolizável (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

3.6.3 PROTEÍNAS

As proteínas são parte de um grande grupo de substâncias com estruturas moleculares semelhantes, porém, com funções biológicas distintas, também são os maiores constituintes de toda célula viva (CECCHI, 2003; RODRIGUES, 2010). Vale ressaltar que nos alimentos, além da função nutricional, as proteínas também possuem propriedades sensoriais e de textura, e podem ocorrer combinadas com lipídios e carboidratos (CECCHI, 2003).

A porcentagem de proteínas em alimentos é praticamente constante, aproximadamente 16%, o elemento nitrogênio está presente na estrutura de qualquer proteína, portanto, a determinação do teor de proteínas de um alimento está diretamente ligada a quantidade de nitrogênio que este possui (RODRIGUES, 2010).

A determinação das proteínas é, em geral, feita pelo método de Kjeldahl, que determina a quantidade de nitrogênio orgânico total, tanto o proteico como o não proteico. O nitrogênio não proteico constitui de uma porção muito pequena do nitrogênio orgânico total, podendo ser desprezada do resultado final. O método é baseado na digestão ácida da amostra até a oxidação do carbono e hidrogênio, o nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônia, que é liberada com NaOH concentrado e coletada por uma solução de ácido bórico, formando borato de amônia, o processo acontece segundo a reação 1 (CECCHI, 2003; RODRIGUES, 2010).



Após o recolhimento da amostra, a determinação quantitativa da amônia, é feita por titulação com ácido sulfúrico.

3.6.4 FIBRAS BRUTAS

Fibras é o nome dado as frações de celulose, lignina insolúvel e pentosanas, responsáveis pela estrutura celular das plantas. Quimicamente as fibras são partes dos carboidratos que resistem a ação das secreções do trato gastrointestinal, não possuem valor nutritivo, mas são excepcionalmente necessárias para os movimentos peristálticos do intestino (CECCHI, 2003; “INSTITUTO ADOLF LUTZ”, 2008; RODRIGUES, 2010).

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras das espécies estudadas (*Aristolochia cymbifera*, *Cordia salicifolia*, *Echinodorus gradiflorus* e *Polygonum acre*) foram fornecidas pela EPAGRI – Itajaí de Santa Catarina.

As amostras das plantas recebidas foram previamente secas. Após o recebimento, foram trituradas utilizando moinho do tipo Willye, marca TECNAL, modelo TE-650, até obtenção de um pó fino.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Foram pesados 2g de amostra, adicionados 25 mL de solução etanol:água (80:20, v:v) e a mistura aquecida em banho maria à 70°C durante 30 minutos, e filtradas. O extrato obtido foi armazenado sob refrigeração, e abrigado da luz.

Para as análises de compostos fenólicos e antioxidantes, as amostras foram liofilizadas. A partir disso, foram obtidos extratos de 1000 ppm de cada amostra, a partir do extrato concentrado, foram obtidas as diluições e realizadas as análises, para Fenólicos e ABTS, 500 ppm, para DPPH e FRAP, 250 ppm.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•

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

realização da técnica consiste na adição de 0,5 mL do extrato (250 ppm), 3 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical de DPPH $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em etanol. Em seguida, a mistura de reação foi deixada em repouso durante o período de 1 hora para posterior leitura em espectrofotômetro à 517 nm. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica utilizando trolox como padrão, o resultado foi expresso em μmol de trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS⁺

A metodologia utilizada para a captura do radical ABTS foi descrita por Re et al (1999). com algumas modificações. O radical ABTS foi formado pela reação de 5 mL de ABTS 7 mmol L^{-1} com 88 μL de persulfato de potássio 140 mmol 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 a 734 nm. O método consiste na adição de 30 μL do extrato da planta (1:5) 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 foi construída uma curva analítica utilizando o antioxidante Trolox padrão, o resultado foi expresso em μmol de Trolox por g de amostra ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) (RE et al., 1999).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP

A metodologia de redução do ferro FRAP utilizada 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 de uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mmol L^{-1} e 2,5 mL de cloreto de ferro em solução aquosa 20

mmol L⁻¹, e utilizado logo após o preparo. O método consiste na mistura de 100 µL do extrato (250 ppm) com 3 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria à 37°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 µmol de sulfato ferroso por grama de amostra (µmol FeSO₄ g⁻¹) (BENZIE; STRAIN, 1996).

4.6 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO REAGENTE FOLIN-CIOCALTEAU

A quantificação do teor de fenólicos totais presentes no extrato do fruto foi realizada em triplicata, utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al (1965). O mesmo consiste na mistura de 0,5 mL do extrato (500 ppm) com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 e 2,0 mL de Na₂CO₃ 4%. A mistura foi deixada em incubação no escuro durante um período de 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas as leituras da absorbância em espectrofotômetro a 740 nm. Para a quantificação do conteúdo de fenólicos totais, foi construída uma curva analítica utilizando o ácido gálico como padrão, o resultado foi expresso em mg de equivalente ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹) (SINGLETON; ROSSI JR., 1965).

4.7 CINZAS

A quantificação das cinzas (matéria mineral) das quatro espécies estudadas foi realizada em triplicata, utilizando o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), com modificações. Segundo este método, uma cápsula de porcelana deve ser previamente aquecida na mufla à 550 °C, resfriada no dessecador à temperatura ambiente e pesada. Em seguida deve-se pesar de 1 à 10 g de amostra na cápsula, a

incineração deverá ser feita na mufla à 550 °C até eliminação completa do carvão. As cinzas devem ser brancas ou acinzentadas, após a incineração a capsula deve ser resfriada em dessecador à temperatura ambiente, e em seguida pesada (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

4.8 LIPÍDIOS

A quantificação do teor de gorduras, foi realizada como descrito por SILVA e QUEIROZ (2002), com modificações. Em um cartucho extrator preparado com filtro de papel, deve-se pesar cerca de 1,5 g de amostra, secar em estufa á 100°C pelo período de cinco horas. O procedimento de secagem deve ser realizado também para os béqueres, esfriados em dessecador e o peso deve ser registrado. Após alinhar no extrator os béqueres com seus respectivos extratores, os cartuchos de vidro e extratores devem ser colocados no suporte do extrator de vidro. Adiciona-se aproximadamente 40 mL de éter dietílico anidro em cada béquer. A extração deve prosseguir ao quente, por um período de 4 horas. Após o período de extração o éter deve escoar para fora dos dedais de vidro. Em seguida deve-se realizar a destilação na temperatura máxima do extrator, até que reste somente uma fina camada de éter no fundo do béquer. Os béqueres devem ser secos em estufa por convecção à 105°C, após esfriar o peso do béquer deve ser registrado (SILVA; QUEIROZ, 2002).

4.9 PROTEÍNAS

A determinação do teor de nitrogênio total, foi baseado no método Kjeldahl descrito por SILVA e QUEIROZ (2002), com modificações. Em um tubo de digestão, pesa-se aproximadamente 200 mg de amostra seca, em seguida adiciona-se 0,7 g da mistura digestora e 2 mL de H₂SO₄. A digestão deve ser iniciada em temperatura moderada e seguir até o máximo de 350°C, até ocorrer o clareamento da solução.

Após o esfriamento, o tubo digestor deve ser transferido com a amostra para um conjunto de destilação, e adiciona-se 5 mL de NaOH. Em um erlenmeyer é adicionado 5 mL de indicador ácido bórico (solução receptora), a destilação é realizada por arraste e o terminal do condensador deve estar mergulhado na solução receptora para que a amônia seja completamente liberada. Finalmente, a solução final deve ser titulada com H_2SO_4 0,05 M (SILVA; QUEIROZ, 2002).

4.10 FIBRA BRUTA

A quantificação da fibra bruta presente nas três espécies estudadas, foi realizada em triplicata pelo método descrito por SILVA e QUEIROZ (2002). As amostras devem ser pesadas (~3g), em seguida deve-se realizar digestão ácida (H_2SO_4 – 1,25%) e básica (NaOH – 1,25%) em aparelho digestor para determinação de fibra bruta, ao final de cada digestão, as amostras devem ser lavadas em água destilada fervente até que o material seja neutralizado. Após a digestão, é realizada a lavagem das amostras com álcool e acetona, a fim de que sejam eliminados compostos provenientes da digestão. Em seguida, os resíduos devem ser secados em estufa por 6 h, após o período de secagem, deve-se registrar o peso de cada resíduo. Logo após, os resíduos devem ser queimados em mufla à 500°C por duas horas, os resíduos da incineração devem ser pesados. O teor de fibras brutas do material, é a diferença entre o peso antes e após a queima.

4.11 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para identificação dos compostos fenólicos presentes, as amostras foram analisadas no Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência acoplado à um detector de arranjo de fotodiodos. Foram utilizados padrões autênticos de ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido cumárico, ácido siríngico, epicatequina, rutina, ácido salicílico, miricetina, resveratrol e quercetina.

Para a análise, foi utilizada a metodologia desenvolvida por SILVA (2016). Foi injetado 10 μL de amostra com fluxo de 1 mL min^{-1} , e utilizado um gradiente de fases com a seguinte composição: Fase móvel A: água:ácido acético (98:2); e Fase móvel B: acetonitrila:água:ácido acético (40:58:2), num tempo de corrida de 45 minutos. A coluna utilizada foi Microsorb-MV 100-5 C18, fase reversa (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) Varian à 30 °C, e detecção por varredura de espectro de 240 – 400 nm.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de analisar as diferenças entre os resultados obtidos para as amostras em questão, foi realizado o teste de Tukey. Para isso, foi utilizado o software estatístico Assitat 7.7 pt.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com o objetivo de comparar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir das folhas da *C. salicifolia*, *P. acre* e *E. grandiflorus*, e caule da *A. cymbifera*. Foram realizadas as análises espectrofotométricas e entre as espécies estudadas, a *C. salicifolia* apresentou o maior teor de compostos fenólicos, diferindo significativamente das demais (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos fenólicos e atividade antioxidante determinados pelos métodos Fenóis, FRAP, ABTS e DPPH.

	Fenóis (mg EAG g ⁻¹)	FRAP (μmol Fe ²⁺ g ⁻¹)	ABTS (μmol Trolox g ⁻¹)	DPPH (μmol Trolox g ⁻¹)
<i>C. salicifolia</i>	156,97 ^a ± 0,918	1267,3 ^c ±25,42	2533,3 ^a ± 7,024	279,6 ^c ± 13,22
<i>A.cymbifera</i>	120,83 ^b ± 1,634	2039,3 ^a ± 8,083	1290,7 ^b ± 31,39	377,6 ^a ± 9,304
<i>P. acre</i>	79,800 ^c ± 0,000	1307,3 ^c ± 32,15	912,00 ^d ± 0,000	276,1 ^c ± 8,776
<i>E.grandiflorus</i>	80,680 ^c ± 3,248	1480,0 ^b ± 114,9	1040,7 ^c ± 10,07	309,2 ^b ± 8,681

Os dados estão representados pela média ± o desvio padrão. Os valores médios de uma mesma coluna com diferentes expoentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.1.1 *Cordia salicifolia*

Avaliando o perfil fitoquímico, SANTI et al. (2014) verificaram que o extrato etanólico bruto da espécie *C. verbenácea* apresentou um teor de fenóis totais de 79,48 mg.EAG.g⁻¹, um valor significativamente menor que o obtido para a *C. salicifolia*, 156,97 mg.EAG.g⁻¹, no presente estudo.

Em relação as análises de atividade antioxidante, a espécie obteve o melhor resultado para o parâmetro ABTS seguido do FRAP, destacando-se com um teor de $2533,3^a \pm 7,024$ ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) e $1267,3^c \pm 25,42$ ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$) respectivamente. Em estudo realizado por SOARES et al., (2008), onde avaliou-se a atividade antioxidante de cascas de uva, foram obtidos entre 89,22 e 157,31 ($\mu\text{mol } 100\text{g}^{-1}$), valores expressivamente menores que os encontrados neste estudo. Já o método de redução do ferro, um estudo realizado com várias hortaliças mostrou que a maior redução do Fe^{+3} foi para o alface com $0,45 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$, também um valor muito inferior ao obtido para a espécie estudada (TIVERON, 2010).

5.1.2 *Aristolochia cymbifera*

A espécie *A. cymbifera*, também apresentou uma boa capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu $120,83^b \pm 1,634$ (mg EAG g^{-1}), isso pode estar relacionado com a presença de bi e tetraflavonóides na amostra, que foram identificados e isolados por MACHADO e LOPES (2008). A presença de lignanas e dirtepenos, identificados por LUCIA e BOLZANI (1988), também contribui para o alto valor de compostos fenólicos.

Os compostos presentes nesta espécie, também contribuem expressivamente para alta capacidade antioxidante. Os métodos que apresentaram melhores resultados, foram FRAP com $2039,3^a \pm 8,083$ ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$), e ABTS com $1290,7^b \pm 31,39$ ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$). Em um estudo comparativo feito por MORAIS et al. (2013), o mesocarpo da espécie *Caryocar brasiliense* apresentou altos valores para os parâmetros ABTS ($1.230,00 \pm 0,125$ uM trolox g^{-1}) e FRAP $2.085,70 \pm 0,533$ (uM trolox g^{-1}).

5.1.3 *Polygonum acre*

A espécie *P. acre*, apresentou o menor teor de compostos fenólicos entre as espécies estudadas, entretanto, ainda é possível considerar como um teor significativo de compostos fenólicos totais. De acordo com LORENZI e MATOS (2008), a espécie sinônima *Polygonum hydropiproides*, apresenta elevado teor de

flavonóides em sua composição, o que contribui significativamente para a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes.

5.1.4 *Echinodorus grandiflorus*

A *Echinodorus grandiflorus*, apresentou um bom resultado para compostos fenólicos, não diferindo significativamente de *P. acre*. Segundo PRANDO et al. (2015) a espécie apresenta uma grande variedade de compostos fenólicos, dentre os quais pode-se destacar flavonoides. MASSOLINI et al. (2013) identificaram catequina, ácido clorogênico, ácido ferulico, vitexina, epicatequina, teofilina e cafeína, típicos compostos fenólicos presentes em plantas.

5.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

As amostras foram submetidas à caracterização por CLAE-DAD, os extratos mostraram um perfil complexo para as espécies, com vários sinais intensos e aglomerados. Esse comportamento é característico de plantas, já que essas, possuem uma matriz extremamente complexa e diversificada em compostos.

5.2.3 *Cordia salicifolia*

A espécie apresentou um significativo sinal, no tempo de retenção de 19,04 min. Esse tempo, pode ser associado ao fenólico, ácido cumárico (Figura 11.a). Paralelamente ao tempo de retenção característico, pode-se observar o padrão de similaridade na absorção do composto na região do visível (Figura 11.b).

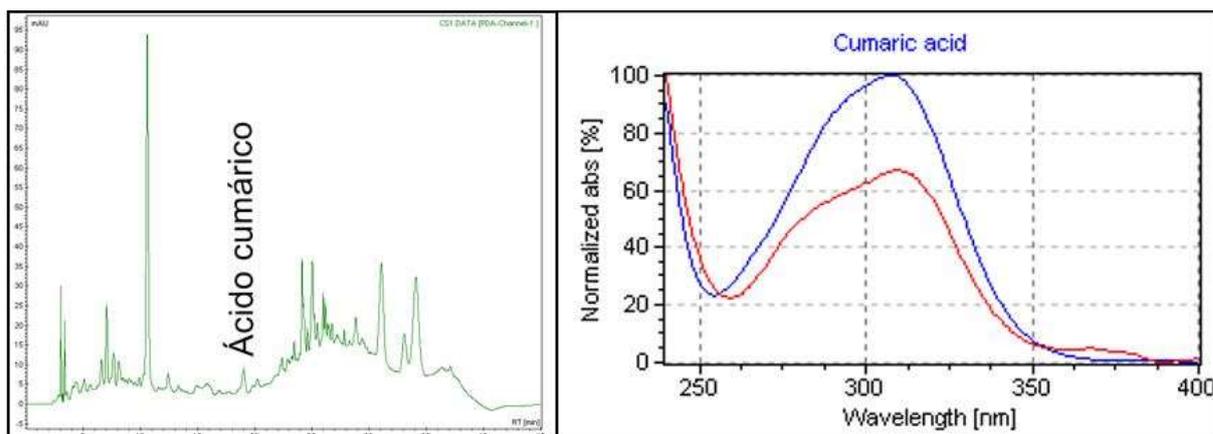


Figura 11: Cromatograma da espécie *Cordia salicifolia*; Comparação de similaridade de absorção no visível

Fonte: Autoria própria

5.2.2 *Aristolochia cymbifera*

Foi identificado para a espécie *A. cymbifera*, o fenólico, ácido cumárico, com tempo de retenção em 19,27 minutos. A comparação da absorção do composto com o padrão, mostra grande similaridade, confirmando o composto na estrutura da planta em questão (Figura 12).

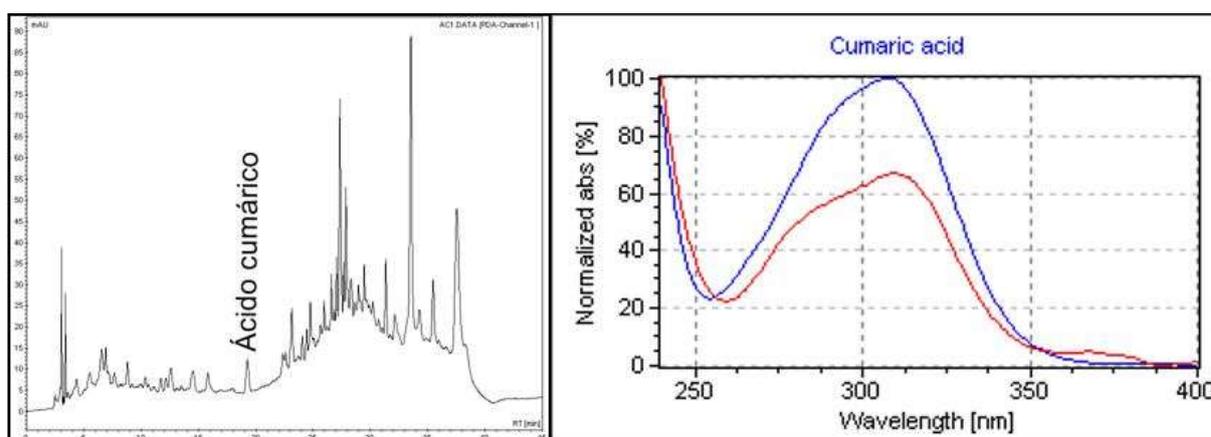


Figura 12: Cromatograma da espécie *Aristolochia cymbifera*; Comparação de similaridade de absorção no visível

Fonte: Autoria própria

5.2.3 *Polygonum acre*

A *P. acre*, foi a espécie em que houve maior identificação de compostos. A comparação dos tempos de retenção e comprimento de onda de absorção também possibilitou a identificação dos seguintes compostos: Ácido Gálico com tempo de retenção 4,91 minutos (13.a), Catequina com 9,84 minutos (13.b), Ácido Ferrúlico com 22,15 minutos (13.c), e Rutina 24,32 minutos (13.d), como observado na Figura 13. Os padrões de absorção também estão condizentes com a amostra estudada.

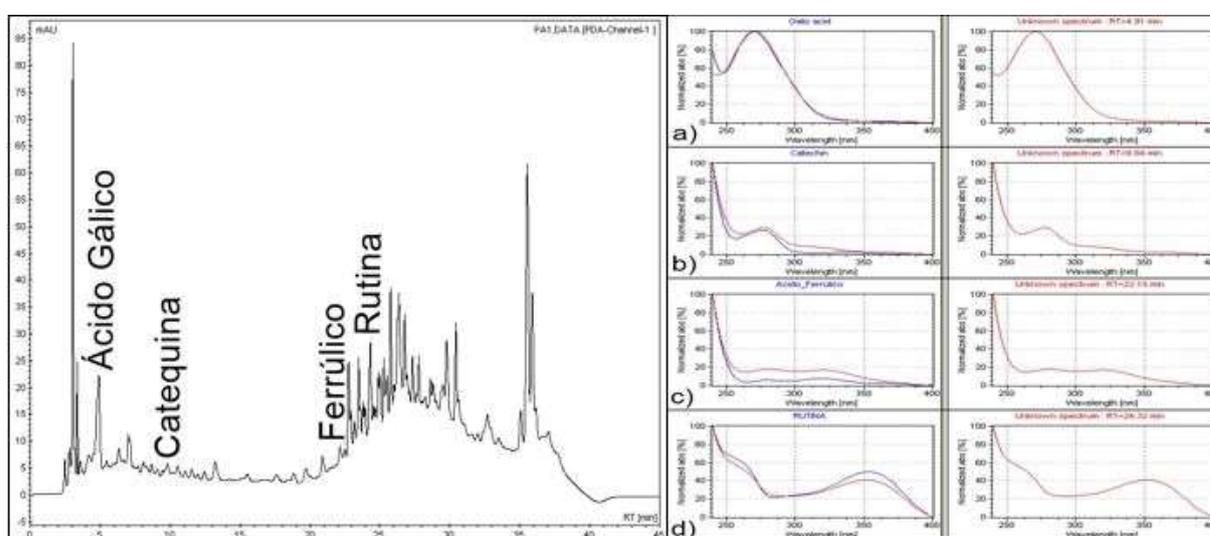


Figura 13: Cromatograma da espécie *Polygonum acre*; Comparação de similaridade de absorção no visível

Fonte: Autoria própria

5.2.4 *Echinodorus grandiflorus*

O mesmo composto identificado para as amostras anteriores, foi encontrado também na estrutura da espécie *E. grandiflorus*, o ácido cumárico, que apresentou um tempo de retenção de 18,87 minutos. O padrão de similaridade na absorção também condiz com o composto em questão, nesse caso observa-se apenas que a concentração do composto está menor que o padrão comparativo (Figura 14).

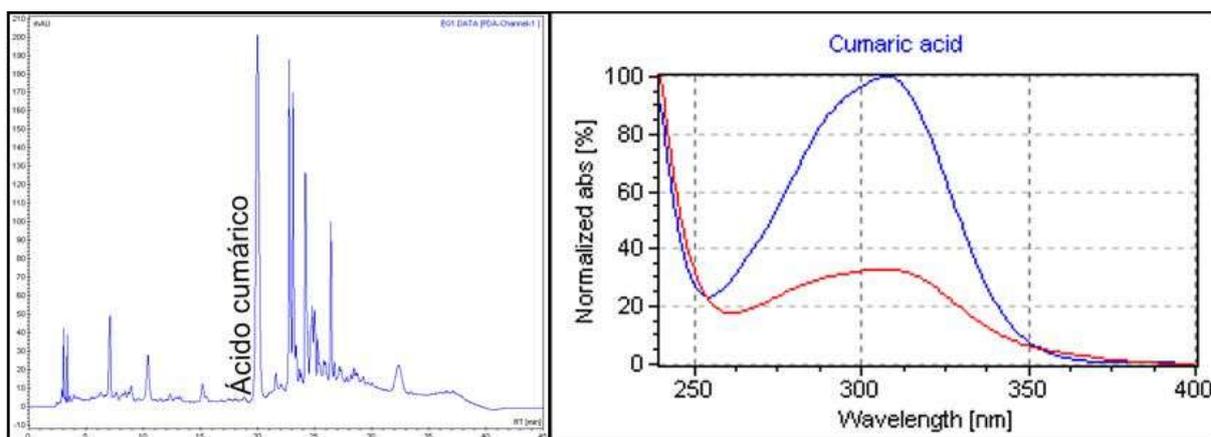


Figura 4: Cromatograma da espécie *Echinodorus grandiflorus*; Comparação de similaridade de absorção no visível

Fonte: Autoria própria

5.2.5 Quantificação dos compostos identificados

Após a comparação e identificação, os compostos obtidos foram quantificados, e seus resultados estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Concentração dos compostos identificados por cromatografia

Composto	Espécie	Concentração ($\mu\text{g/g}$ de amostra)
Ácido cumárico	<i>C. salicifolia</i>	46,19
	<i>A. cymbifera</i>	43,44
	<i>E. grandiflorus</i>	20,22
Ácido gálico	<i>Polygonum acre</i>	113,53
Catequina	<i>Polygonum acre</i>	59,41
Ácido Ferrúlico	<i>Polygonum acre</i>	26,33
Rutina	<i>Polygonum acre</i>	150,17

5.3 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

A tabela 4 relaciona os valores obtidos para os principais componentes que constituem os alimentos.

Tabela 3: Resultados para análises bromatológicas

	%CINZAS	%PROTEÍNAS	%LIPÍDIOS	%FIBRA BRUTA
<i>C. salicifolia</i>	6,529 ^c ± 0,167	12,72 ^a ± 0,327	17,48 ± 21,09	31,661 ^{ab} ± 1,829
<i>A. cymbifera</i>	5,002 ^d ± 0,098	9,381 ^{ab} ± 0,329	2,332 ± 0,283	38,629 ^a ± 1,991
<i>P. acre</i>	10,224 ^a ± 0,202	11,52 ^{ab} ± 2,234	0,182 ± 0,113	27,549 ^b ± 3,683
<i>E. grandiflorus</i>	7,689 ^b ± 0,279	4,374 ^b ± 5,930	1,006 ± 0,320	34,726 ^{ab} ± 3,187

Os dados estão representados pela média ± o desvio padrão. Os valores médios de uma mesma coluna com diferentes expoentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O teor de cinzas de uma determinada amostra, apenas fornece uma estimativa da quantidade- de matéria mineral (não volátil) contida no alimento. Nesse caso observa-se que a espécie *P. acre* possui a maior quantidade de matéria mineral quando comparada às outras espécies, tendo possivelmente maiores teores de íons como cálcio, potássio, sódio, ferro, e ânions como sulfatos, cloretos, silicatos e fosfatos.

Em relação ao teor de proteínas, as espécies *C. salicifolia* e *P. acre*, possuem maiores teores de proteínas em relação às demais espécies. Para todas as espécies o teor de proteínas obtido foi satisfatório, nesse sentido, as espécies estudadas possuem elevadas quantidades de nitrogênio proteico.

No estudo de PEDRAL et al.(2015) foi realizada caracterização da espécie *Moringa oleífera*, foi obtido um valor de 16,47% de proteínas, resultado muito próximo do encontrado para a *Cordia salicifolia*. Em relação ao teor de lipídios, para a *Moringa* foi encontrado um teor de 7,57%, valor muito inferior ao encontrado para *Cordia salicifolia* neste estudo. A *Moringa* possui um teor de 8,47% de cinzas, comparável ao resultado obtido para a *E. grandiflorus*.

Na literatura não são encontrados estudos para as espécies aqui tratadas em relação aos parâmetros analisados neste trabalho. Os teores de fibras brutas obtidos para as espécies em questão apresentaram valores muito próximos entre si, e pelo teste de Tukey apresentaram pouca diferença significativa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies estudadas neste trabalho são usadas na medicina popular, porém, existem poucos estudos científicos realizados com essas plantas no sentido de caracterizá-las quimicamente. O teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante determinados apresentou resultados satisfatórios para todas as espécies, sendo a *A. cymbifera* a espécie que apresentou os melhores resultados para atividade antioxidante, e *C. salicifolia* o melhor teor de compostos fenólicos, entre as espécies estudadas.

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos, Ácido Cumárico, Ácido Gálico, Catequina, Ácido ferrúlico e Rutina, dá margem para intensificar os estudos a procura de aplicações e identificação de outros compostos presentes nessas plantas. Nesse sentido, a espécie *Polygonum acre* se destacou apresentando um alto teor de Ácido Gálico e Rutina.

Para a caracterização bromatológica das espécies, a *Cordia salicifolia*, apresentou os melhores resultados para os parâmetros proteínas e lipídeos e um alto valor para o parâmetro fibra bruta, nesse sentido, é a espécie com maior potencial nutritivo dentre as demais.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. DA. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 37, n. 4, p. 85–91, 2003.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

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.

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.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas - SP: Editora da Unicamp, 2003.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de Plantas medicinais condimentares e aromáticas**. 2. ed. Joticabal: [s.n.].

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872–879, 2002.

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

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 2, p. 32–39, mar. 2007.

HAYASHI, K. et al. Antiviral Activity of an Extract of *Cordia salicifolia* on Herpes Simplex Virus Type 1. **Planta médica**, v. 56, n. 5, p. 439–443, 1990.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. São Paulo, 2008.

LOPES, R. et al. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 3, p. 18–22, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUCIA, M. X.; BOLZANI, D. A. S. Lignans and diterpenes. v. 27, n. 7, p. 7–10, 1988.
MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Tetraflavonoid and biflavonoids from *Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 18, p. 3095–3102, 2008.

MASSOLINI, M. M. et al. COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* “CHAPÉU DE COURO”. **Revista HCPA**, v. 33, 2013.

MATIAS, E. F. F. et al. The genus *Cordia*: Botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 5, p. 542–552, 2015.

MORAIS, M. L. et al. Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do Cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 355–360, 2013.
OLIVEIRA, T. T. DE; et al. Flavonóides e Aterosclerose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 49–54, 2010.

OLIVEIRA, S. DE. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis** São Paulo, 2011.

PEDRAL, A. D. L. et al. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FOLHAS DA MORINGA OLEÍFERA DESIDRATADAS POR SECAGEM CONVECTIVA E LIOFILIZAÇÃO. p. 33–39, 2015.

PRANDO, T. B. L. et al. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 369–378, 2015.

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.

RODRIGUES, R. C. **Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos** Pelotas Embrapa Clima Temperado, , 2010.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53–60, 2007.

SANTI, M. M. et al. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 256–261, 2014.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. DE. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, 2004.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. DE. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds , carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. v. 31, p. 669–682, 2010.

SILVA, R. C. O. DA. **Validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para determinação de compostos fenólicos e atividade biológica em coprodutos agroindustriais**. [s.l.: s.n.].

SINGH, R.; KUMARI, N. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorrossi* Gaertn. - A valuable medicinal tree. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 1–8, 2015.

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

SKOOG, D. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Editora Thomson, 2011.

SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59–64, 2008.

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, jan. 2007.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. [s.l.: s.n.].

WEZEL, G. E. **Radicais livres, antioxidantes neutracêuticos, fenólicos e polifenólicos vegetais**. São Leopoldo: UNISINOS, 2012.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. **Antioxidants in health and disease**. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/content/54/3/176.full.pdf+html>>.