

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**AMÁLIA SOARES DOS REIS
RENAN AUGUSTO WESCHENFELDER TAVARES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
METANÓLICO E DAS FRAÇÕES APOLARES E POLARES DE
Quassia amara L. (SIMAROUBACEAE)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2014

AMÁLIA SOARES DOS REIS
RENAN AUGUSTO WESCHENFELDER TAVARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
METANÓLICO E DAS FRAÇÕES APOLARES E POLARES DE
Quassia amara L. (SIMAROUACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso Bacharelado em Química – habilitação bacharelado da UTFPR – Campus Pato Branco.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Solange Teresinha Carpes
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Marlene Capelin Ignoato

Pato Branco
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO E DAS FRAÇÕES APOLARES E POLARES DE *Quassia amara* L. (SIMAROUBACEAE)** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 4.2.2014-B.

Fizeram parte da banca os professores:

Prof.^a Dr.^a Solange Teresinha Carpes

Prof.^a Dr.^a Marlene Capelin Ignoato

Jacqueline de Florio Almeida

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á Otávio Augusto Weschenfelder Tavares (*in memoriam*), meu querido irmão, o qual continua a cuidar de mim e acreditar que eu posso ir muito mais além. É pra você meu irmão, que nunca permitiu que eu desistisse de minha formação acadêmica, agradeço de coração tudo que fizeste por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos nossos pais, Ronaldo e Geni, Luiz Carlos e Ilaine (*in memorian*), por todo incentivo, carinho e por sempre nos apoiar nos momentos difíceis pelos quais passamos durante toda esta caminhada.

As nossas famílias por acreditarem em nós.

As nossas orientadoras, professora Dr.^a Solange Teresinha Carpes e professora Dr.^a Marlene Capelin Ignoato, pelo profissionalismo, orientação e amizade, além da confiança depositada em nós durante todas as etapas deste trabalho.

A mestranda Jacqueline de Florio Almeida, por aceitar fazer parte da banca e contribuir para o trabalho, assim como as mestrandas Cristiane Moura e Daiane Pereira, por toda ajuda na realização das análises, além da amizade e companheirismo.

A Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Câmpus Pato Branco, pela disponibilidade em realizar as análises.

Enfim, agradecemos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, de forma especial a Letícia Danguí e Thariane Bicas por todo apoio, compreensão, carinho e amizade.

EPÍGRAFE

"Olhamos as montanhas e dizemos que são eternas, e é o que parecem ser...

Mas, no correr do tempo, montanhas erguem-se e ruem, rios mudam de curso, estrelas caem de céu, e grandes cidades afundam-se no mar.

Pensamos que até os deuses morrem.

Tudo muda". - Mestre Luwin

RESUMO

REIS, Amália S.; TAVARES, Renan A. W. Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato Metanólico e das Frações Apolares e Polares de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). (54) f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco 2014.

A *Quassia amara* L. é uma planta nativa do norte do Brasil, pertencente a família das Simaroubaceae. Na medicina popular é largamente utilizada para combater problemas gastrointestinais, dores de cabeça, e a malária. Isto se deve a presença de compostos bioativos, como agentes antioxidantes. A ingestão destes suplementos, ou alimentos que contenham antioxidantes reduzem o dano oxidativo causado pelos radicais livres no corpo, entretanto o uso de antioxidantes sintéticos, quando em doses elevadas, atribuem efeitos deletérios ao organismo, como doenças degenerativas e cardiovasculares. Conseqüentemente os produtos naturais têm ganhado destaque como fontes valiosas para o desenvolvimento de novos princípios ativos, permitindo o avanço na descoberta de biomoléculas com potencial aplicação em várias áreas da indústria, principalmente na alimentícia. Deste modo o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante (AA) do extrato metanólico da *Quassia amara* (EMQa) e de suas frações hexânica (FHQa), acetato de etila (FACQa), e metanólica (FMQa), obtidas através de fracionamento líquido-líquido, por meio da determinação do teor de compostos fenólicos, captura do radical DPPH (expresso em IC₅₀ e Trolox), poder de redução do Ferro (FRAP) e ABTS, além da avaliação da AA foi realizada a caracterização das amostras por infravermelho e identificado os compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Observa-se que a FACQa apresentou um maior sequestro de radicais como ABTS e DPPH expresso em trolox, bem como elevados teores de fenólicos totais. A EMQa também obteve valores semelhantes, e apresentou o menor coeficiente de inibição (IC₅₀ = 15,42 µg.mL⁻¹), conseqüentemente maior atividade antioxidante, devido ao fato do radical DPPH avaliar apenas o poder redutor do antioxidante. A FHQa apresentou os menores resultados de AA. A caracterização das amostras corroborou com os elevados teores de fenólicos, assim como na CLAE que permitiu a identificação de alguns compostos fenólicos como o ácido gálico e cumárico. Conclui-se que o fracionamento foi eficiente, pois os compostos foram devidamente separados de acordo com sua polaridade e a extração dos compostos que apresentaram melhor AA foi com solventes mais polares, a *Quassia amara* pode ser considerada um opção de substituição dos antioxidantes sintéticos amplamente utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia.

Palavras-chave: Bioatividade, compostos fenólicos, plantas medicinais.

ABSTRACT

REIS, Amália S.; TAVARES, Renan A. W. Antioxidant Activity Evaluation of methanol extract and fractions nonpolar and polar of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). (54) f. Work Course Conclusion - Course in Chemistry (BS in Industrial Chemistry/ Degree in Chemistry), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco 2014.

The *Quassia amara* L. is a native plant of northern Brazil, belonging to the family of Simaroubaceae. In folk medicine is widely used for combating gastrointestinal disorders, headaches, and malaria. This is due to the presence of bioactive compounds, such as antioxidants. The ingestion of these supplements, or foods containing antioxidants reduce oxidative damage caused by free radicals in the body, however the use of synthetic antioxidants in high doses, give deleterious effects to the organism, such as degenerative and cardiovascular diseases. Consequently, the natural products have gained prominence as valuable for the development of new active principles sources, allowing progress in the discovery of biomolecules with potential applications in many areas of industry, especially in the food. Therefore, the present study was to evaluate the antioxidant activity (AA) of the methanol extract of *Quassia amara* (EMQa) and its hexane fractions (FHQa), ethyl acetate (FACQa), and methanol (FMQa), obtained by fractionation Liquid-liquid through the determination of the content of phenolic compounds in the DPPH yield (expressed in IC₅₀, and Trolox) of reduced iron power (FRAP) and ABTS, In addition to the evaluation of AA samples characterization was performed by infrared and identified phenolic compounds by high performance liquid chromatography (HPLC). It is observed that had a greater FACQa sequestration radicals as ABTS, DPPH and expressed as trolox and high phenolic content. The EMQa also obtained similar values and presents the lowest inhibition coefficient (IC₅₀ = 15,42 µg.mL⁻¹) thus higher antioxidant activity. Probably due to the synergism between the various phenolic compounds present in the crude extract. The FHQa had the lowest AA results. The characterization of the samples confirmed the high phenolic content, as well as HPLC allow for the identification of some phenolic compounds like gallic acid and coumaric acid. It can be concluded that the fractionation was efficient, because the compounds suitably were separated according to their polarity and extraction of compounds which showed the best AA was more polar solvents, and the *Quassia amara* can be considered a replacement option of synthetic antioxidants widely used in the pharmaceutical and food industry.

Keywords: Bioactivity, Phenolic compound, medical herbs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Quassia amara</i> L.....	17
Figura 2: Estrutura da quassina e neoquassina.	18
Figura 3: Estrutura dos antioxidantes sintéticos mais utilizados nas indústrias.	20
Figura 4 Molécula dos tocoferóis.....	21
Figura 5: Estrutura química dos ácidos benzoicos.	22
Figura 6: Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.	23
Figura 7: Estrutura química das cumarinas.....	23
Figura 8: Estabilização do Radical DPPH.	24
Figura 9: Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	25
Figura 10: Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	26
Figura 11: Fluxograma das atividades realizadas.	27
Figura 12: Extrato Metanólico de <i>Quassia amara</i> liofilizado.....	28
Figura 13: Fracionamento líquido-líquido em funil de separação com o EMQa.	28
Figura 14: Extrato metanólico de <i>Quassia amara</i> , fração hexânica, fração acetato de etila e fração metanólica, respectivamente.	29
Figura 15 Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE).	31
Figura 16: Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier e acessório UATR.	32
Figura 17: Gráfico da curva padrão de ácido gálico para quantificação de fenólicos.	36
Figura 18 Cromatograma do mix de padrões autênticos utilizados.	39
Figura 19: Cromatograma da amostra FHQa.	39
Figura 20: Cromatograma da amostra FAcQa.	40
Figura 21: Cromatograma da amostra FMQa.....	40
Figura 22: Espectro de FTIR das amostras.....	41
Figura 23: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC ₅₀ do EMQa.	43
Figura 24: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC ₅₀ do FHQa.....	43
Figura 25: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC ₅₀ do FAcQa.	44
Figura 26: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC ₅₀ do FMQa.	44
Figura 27: Gráfico contendo equação da reta utilizada para o método ABTS.....	47
Figura 28: Gráfico contendo equação da reta utilizada para o método FRAP	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teores de compostos fenólicos presentes nas amostras analisadas.....	37
Tabela 2: Valores dos tempos de retenção dos padrões e das amostras.....	38
Tabela 3: Atribuições aos picos obtidos no espectro de FTIR.	42
Tabela 4: Atividade de sequestro do radical DPPH expresso em EC ₅₀	45
Tabela 5: Atividade de sequestro do radical DPPH em referência ao padrão Trolox.	46
Tabela 6: Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS ^{•+}	47
Tabela 7- Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP).	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS.

% AA	Atividade Antioxidante (%)
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EMQa	Extrato metanólico de <i>Quassia amara</i>
FAQa	Fração Acetato de etila de <i>Quassia amara</i>
FHQa	Fração Hexânica de <i>Quassia amara</i>
FMQa	Fração Metanólica de <i>Quassia amara</i>
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	Equivalente em ácido gálico
IC ₅₀	Coeficiente de inibição (concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH•)
mg GAE.g ⁻¹	Miligrama equivalente em ácido gálico por grama de amostra
OMS	Organização Mundial da Saúde
PG	Propil Galato
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
TROLOX	6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL	16
3.2 <i>QUASSIA AMARA</i> L.	16
3.2.1 Quassinóides	17
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	18
3.4 ANTIOXIDANTES	19
3.4.1 Antioxidantes Sintéticos	20
3.4.2 Antioxidantes Naturais	21
3.5 MÉTODOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	23
3.5.1 Método do Radical DPPH●	23
3.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS ^{•+}	24
3.5.3 Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	26
4.2 TRATAMENTO DA AMOSTRA BRUTA DE <i>QUASSIA AMARA</i>	26
4.3 PREPARO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>QUASSIA AMARA</i> (EMQA).....	27
4.4 FRACIONAMENTO POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EMQA.....	28
4.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	29
4.6 TRATAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO E DAS FRAÇÕES PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS.....	29
4.7 ANÁLISES REALIZADAS COM O EMQA E FRAÇÕES.....	30
4.7.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais	30
4.7.1.1 Identificação De Compostos Fenólicos Utilizando CLAE	30
4.7.1.2 Caracterização Espectroscópica Das Amostras.....	31

4.7.2 Avaliação da Atividade Antioxidante do EMQa e Frações	32
4.7.2.1 Atividade de Sequestro do Radical DPPH	32
4.7.2.2 Atividade Antioxidante Expressa em Referencia ao Trolox.....	33
4.7.2.3 Atividade Antioxidante pelo Método ABTS ⁺⁺	33
4.7.2.4 Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro – FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	34
4.8 ANÁLISES	ESTATÍSTICAS
.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EMQA E FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).	34
5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	36
5.2.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos por técnica espectroscópica UV-Vis.....	36
5.2.2 Identificação De Compostos Fenólicos Utilizando CLAE	37
5.2.3 Caracterização Espectroscópica Das Amostras	41
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E SUAS FRAÇÕES	42
5.3.1 Atividade Antioxidante Pelo Método De Sequestro Do Radical DPPH• (2,2 Difenil-1-Picridrazina)	42
5.3.1.1 Coeficiente de inibição IC ₅₀ e porcentagem de inibição	43
5.3.1.2 Atividade antioxidante expressa em referencia ao Trolox	45
5.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺⁺	46
5.3.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP	48
6 CONCLUSÕES	50
7 REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. Uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais foi pela ingestão de ervas e folhas na busca por alívio e cura de doenças (VIEGAS *et al.*, 2006). Com seu potencial justificado historicamente, as plantas medicinais são, na sua maioria, ampla fonte de compostos bioativos para serem explorados, estimulando pesquisas sobre isolamento e mecanismos dos mesmos.

Entre as plantas medicinais, a *Quassia amara L.* destaca-se por ser uma rica fonte de compostos fitoquímicos, presentes tanto nas folhas como na casca (PARVEEN *et al.* 2003). É uma planta da família das *Simaroubaceae*, também conhecida como quássia-amarga, quássia-de-caiena, pau-amarelo, pau-tenente, quássia-da-jamaica, quássia-do-suriname, cássia, pau-amargo, pau-de-surinã, pau-quassia (SÁEZ; SOTO, 2008). Largamente usada na região da Amazônia desde longa data em substituição à casca do quinino para malária, contendo muitos dos mesmos fitoquímicos. Além deste uso, é também empregada como inseticida, tônico contra febre e hepatite, recomendada para diarreias, prisão de ventre, anemias, problemas estomacais e gastrointestinais (LORENZI; MATOS, 2008).

Dentre os seus constituintes químicos, notabilizam-se os quassinóides (considerados marcadores taxonômicos da família *Simaroubaceae*), alcaloides indólicos, esteroides, ácidos alifáticos e ácidos aromáticos (GILBERT; FAVORETO, 2010). Os quassinóides, que quimicamente são considerados triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, apresentam uma ampla faixa de atividade biológica, sobressaindo propriedades anticâncer, antimalárica, inseticida, antiviral e antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2007). Entretanto, raros estudos são encontrados na literatura referente à propriedade antioxidante da *Quassia amara*, sendo que, atualmente, devido à tendência dos consumidores na busca por produtos naturais, a procura por antioxidantes naturais intensificou-se, visando principalmente à substituição dos antioxidantes sintéticos nos alimentos (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

Desse modo, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante do extrato metanólico de *Quassia amara L.* e de suas frações, apolares e polares, obtidas através de fracionamento líquido-líquido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é investigar a atividade antioxidante do extrato metanólico de folhas de *Quassia amara* (EMQa), e das frações apolares e polares, por diferentes metodologias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato metanólico de *Quassia amara* (EMQa).
- Particionar o EMQa por meio de fracionamento líquido-líquido.
- Visualizar o perfil cromatográfico do EMQa e suas frações a partir de CCD.
- Determinar os teores de compostos fenólicos totais no EMQa e nas frações apolares e polares obtidas no fracionamento.
- Identificação de compostos fenólicos por meio da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Caracterização das amostras através de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)
- Verificar o potencial antioxidante do EMQa e de suas frações juntamente com os antioxidantes comerciais BHA e BHT pelo método de sequestro de radical livre DPPH•, captura do radical ABTS^{•+} e pelo poder de redução do ferro - FRAP.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), planta medicinal é qualquer planta que possui, em um dos órgãos ou em toda planta, substâncias com propriedades terapêuticas ou que sejam ponto de partida na síntese de produtos químicos ou farmacêuticos (LIMA *et al.*, 2010). E, considerando a riqueza da diversidade vegetal brasileira, as plantas medicinais são um destaque para o país, possuindo em torno de 23% das espécies existentes em todo o planeta (BATALHA *et al.*, 2003).

A utilização das plantas medicinais principalmente em escala industrial é diversa, destacando-se os setores de fabricação de produtos para uso e aplicação em indústrias de alimentos, higiene pessoal, cosméticos e medicamentos (ALMEIDA, 2004).

O interesse, tanto das indústrias como dos consumidores, por produtos originários de plantas medicinais vem aumentando cada vez mais. Somente com a indústria farmacêutica, estima-se que o Brasil teve faturamento em torno de R\$ 400 milhões advindo de medicamentos originados de plantas (fitoterápicos), em 2004 (ALMEIDA, 2004).

De acordo com (CORRÊA; ALVES, 2008), existe um aumento na demanda de plantas medicinais, tanto no Brasil como no mundo em geral, e é crescente e promissor setores ligados a estas. Desse modo, o estudo químico e farmacológico de plantas medicinais, visando obter novos compostos bioativos é de fundamental interesse na área de Produtos Naturais (IGNOATO, 2012).

3.2 *Quassia amara* L.

A *Quassia amara* L. é uma planta nativa do norte do Brasil, considerada um arbusto grande ou arvoreta, podendo medir até 5 metros de altura, e com inflorescências terminais vermelho-vivo. Pertencente a família das *Simaroubaceae* que é constituída de aproximadamente 32 gêneros e 200 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Esta família é caracterizada pela bioprodução de princípios amargos, assim, muitas espécies dessa família (*Quassia amara*, *Jamaica quassia*, *Simarouba versicolor*), são conhecidas por conterem substâncias amargas,

denominadas quassininas, uma das classes dos compostos quassinóides (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Seus principais componentes químicos são os quassinóides, alcaloides indólicos, esteróides, ácidos alifáticos e ácidos aromáticos. É utilizada a longa data como planta medicinal, principalmente na região amazônica, para combater a malária, problemas gastrointestinais, estimulante de apetite, cefaleia, tontura, arritmia cardíaca, diabetes e também uso como inseticida (GILBERT; FAVORETO, 2010).

Embora se encontre muitos estudos sobre a farmacologia da *Quassia amara* (Figura 1), estudos sobre a atividade antioxidante desta, são escassos.



Figura 1. *Quassia amara* L.
Fonte: Serre du Parc Phoenix (2012)

3.2.1 Quassinóides

Os quassinóides são triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação e são encontrados quase que exclusivamente nas plantas que constituem a família *Simaroubaceae*, sendo assim, considerado um marcador taxonômico da mesma (NUNOMURA *et al.*, 2012). Segundo Almeida (2007), os primeiros quassinóides isolados, em 1835 foram encontrados na madeira da espécie *Quassia amara*, a quassina e a neoquassina (Figura 2).

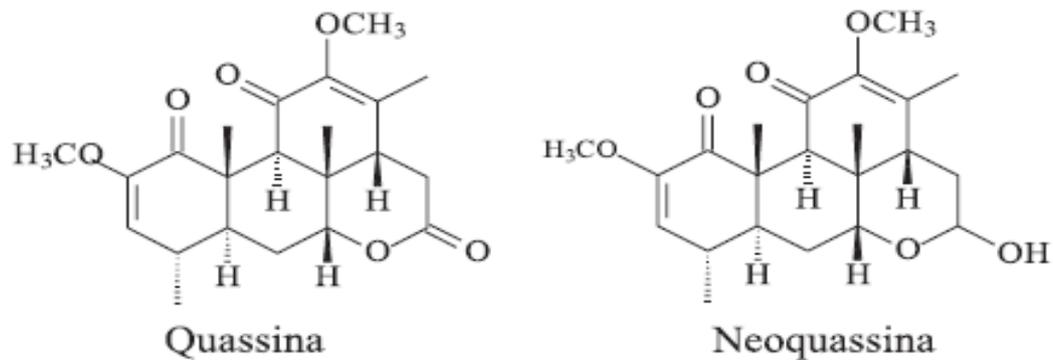


Figura 2: Estrutura da quassina e neoquassina.

Fonte: ALMEIDA, 2007.

Devido sua ampla faixa biológica, os quassinóides vêm despertando grande interesse da comunidade científica. Atividades como antitumoral, antimalárica, fitotóxica, fago-inibidora, inseticida, antiparasitária, antiúlcera e anti-inflamatória são citadas em revisão por Almeida (2007).

Pontualmente, pela sua vasta atividade biológica, os quassinóides possibilitam sua utilização em diversos setores, dando mais ênfase aos estudos relacionados às plantas da família *Simaroubaceae*.

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, substâncias caracterizadas pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático (BRAVO, 1998). Abrangem um grande número de substâncias orgânicas, onde o mais comum é o fenol simples. Estes compostos são facilmente encontrados na natureza, na forma de ésteres ou de heterosídeos, portanto sendo solúveis em água e solventes orgânicos apolares estão amplamente distribuídos no reino vegetal e em micro-organismos (OLDONI, 2007).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente à sua estrutura química e suas propriedades redutoras, pois são estas características que conferem a substância fundamental importância na neutralização ou sequestro de radicais livres e como quelantes de metais de transição, agindo desde a etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007).

3.4 ANTIOXIDANTES

Segundo a Anvisa (Agência Nacional de Segurança Sanitária), antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos, isto ocorre, geralmente, em produtos graxos pois estes são mais suscetíveis a processos de rancidez, sendo este um processo oxidativo onde as cadeias de ácidos graxos, na presença de oxigênio, produzem peróxidos, resultando então em carboxilados de baixo peso molecular, os quais são os responsáveis pelo mau odor exalado destes alimentos (EVANGELISTA, 2009).

Segundo Messias (2009), os mecanismos de ação dos antioxidantes são diversos podendo eles ser: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos.

Os primários são caracterizados por apresentarem estrutura fenólica que promove a remoção ou inativação dos radicais livres, formados no início da reação de rancificação do alimento, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. São exemplos deste grupo os antioxidantes sintéticos butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ), e propil galato (PG), além dos tocoferóis que são naturais (MESSIAS, 2009).

Os antioxidantes sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, porém podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estabilizando a molécula. Deste modo, o oxigênio não poderá mais atuar como propagador da autoxidação. Pertencem a este grupo o ácido ascórbico e seus derivados (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Estas substâncias podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício (MESSIAS, 2009).

Os agentes quelantes agem nos alimentos complexando os íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os

mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (MESSIAS, 2009).

Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (ácido cafeico) (RAMALHO; JORGE, 2006).

3.4.1 Antioxidantes Sintéticos

Dentre os antioxidantes sintéticos, os mais utilizados nas indústrias, principalmente na indústria alimentícia, são o BHA, BHT, TBHQ e PG (FLEMMING, 2011), representados na Figura 3.

A doação de um próton a um radical, regenerando a molécula lipídica e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres é possibilitado pela estrutura destes antioxidantes. Após o cessar da reação, tornando-se um radical livre que se estabiliza sem propagar reações de oxidação (JORGE *et al.*, 2009).

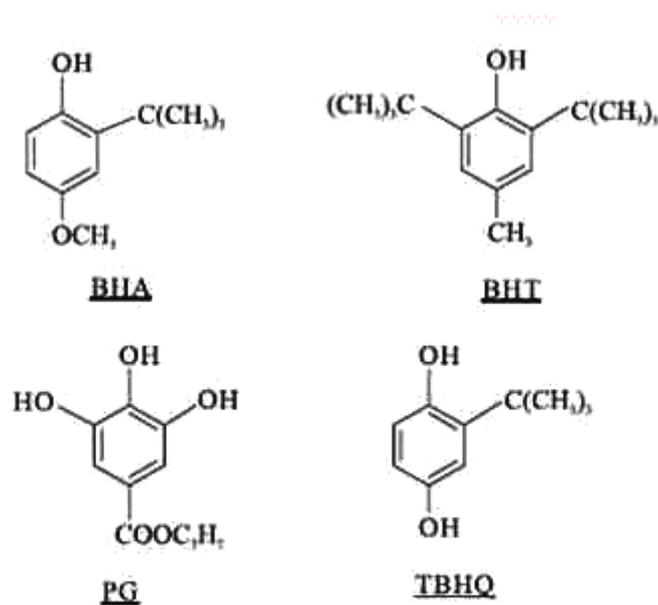


Figura 3: Estrutura dos antioxidantes sintéticos mais utilizados nas indústrias.

Fonte: FLEMMING (2011).

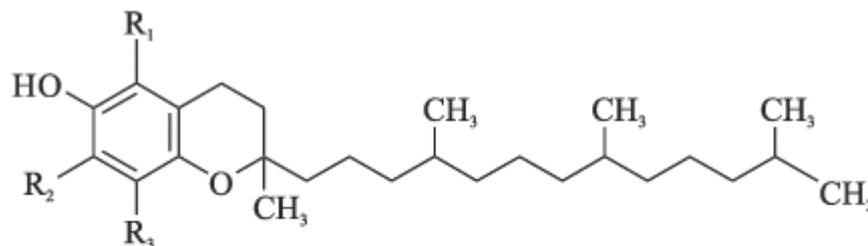
Entretanto, estudos toxicológicos têm demonstrado que há a possibilidade de que o uso desses antioxidantes sintéticos apresente efeitos prejudiciais à saúde, dentre esses, efeitos carcinogênicos (JORGE *et al.*, 2009; PITARO; FIORANI;

JORGE, 2012). Em razão disto, o uso desses antioxidantes em alimentos está cada vez mais restrito, intensificando a busca por antioxidantes naturais.

3.4.2 Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais são moléculas presentes nos alimentos (frutas, vegetais, cereais e especiarias), normalmente em pequena quantidade, que possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres, podendo ser usados também em determinados produtos com o objetivo de reduzir a velocidade das reações de oxidação dos compostos lipídicos. Entre os mais usados podem ser citados os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (RAMALHO; JORGE, 2006).

Atualmente fabricados por síntese, os tocoferóis (Figura 4), estão presentes na maioria dos óleos vegetais. São divididos em quatro grupos, de acordo com a localização dos grupos metila no anel: α , β , γ e δ (RAMALHO; JORGE, 2009).



α - tocoferol: $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$

β - tocoferol: $R_1 = R_3 = CH_3$; $R_2 = H$

γ - tocoferol: $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = CH_3$

δ - tocoferol: $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = CH_3$

Figura 4 Molécula dos tocoferóis.

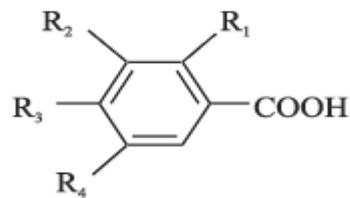
Fonte: RAMALHO; JORGE (2006).

A atividade antioxidante dos tocoferóis deve-se principalmente à sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos a radicais livres lipídicos. Cada um dos quatro grupos varia sua atividade antioxidante de acordo com parâmetros como temperatura, composição, forma da gordura e até mesmo quanto à quantidade presente de tocoferóis (MESSIAS, 2009).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes.

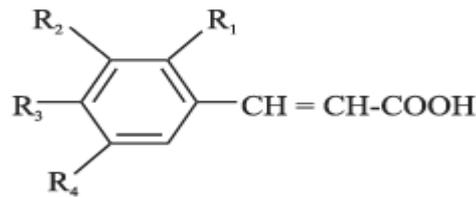
O uso de especiarias como fontes de antioxidantes naturais têm ganhado destaque e tem-se observado que o alecrim e a sálvia apresentam estas características de forma elevada. Vários compostos fenólicos têm sido isolados do alecrim (carnosol, rosmanol, rosmaridifenol e rosmariquinona) e da sálvia (glucosídeos, ácidos fenólicos e derivados terpenos) (ASOLINI *et al.*, 2006).

Devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias, os produtos intermediários formados pela ação desses antioxidantes são relativamente estáveis. Funcionam como sequestradores de radicais, e em algumas vezes, como quelantes de metais. São divididos em três grupos: os ácidos benzoicos (Figura 5), os ácidos cinâmicos (Figura 6) e as cumarinas (Figura 7) (RAMALHO; JORGE, 2006).



Ácido salicílico: $R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido gentísico: $R_1 = R_4 = \text{OH}; R_2 = R_3 = \text{H}$
 Ácido *p*-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$
 Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$
 Ácido gálico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
 Ácido siríngico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$

Figura 5: Estrutura química dos ácidos benzoicos.
 Fonte: RAMALHO; JORGE (2006).



Ácido cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
 Ácido o-cumárico: $R_1 = OH; R_2 = R_3 = R_4 = H$
 Ácido m-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = H; R_2 = OH$
 Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = R_4 = H; R_3 = OH$
 Ácido caféico: $R_1 = R_4 = H; R_2 = R_3 = OH$
 Ácido ferúlico: $R_1 = R_4 = H; R_2 = OCH_3; R_3 = OH$
 Ácido sinápico: $R_1 = H; R_2 = R_4 = OCH_3; R_3 = OH$

Figura 6: Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.
 Fonte: RAMALHO; JORGE (2006).

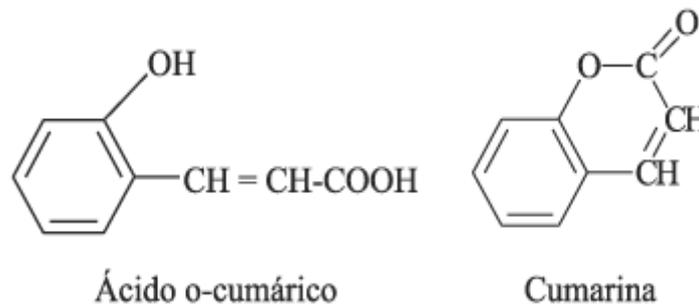


Figura 7: Estrutura química das cumarinas.
 Fonte: RAMALHO; JORGE (2006).

3.5 MÉTODOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Método do Radical DPPH•

O método do radical DPPH• é aplicado para a determinação da capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres. Este método tem sido largamente utilizado devido a sua capacidade de detecção em baixas concentrações e por ser considerado um método rápido, prático e de boa estabilidade (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

O método consiste na capacidade do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), formar radicais livres estáveis em solução etanólica (BISWAS; KONDAIAH;

ANJANEYULU, 2006), de coloração púrpura característica, que na presença de um composto com atividade antioxidante, ou seja, um doador de hidrogênio ou de elétron, perde a coloração e sua intensidade de absorção diminui, de acordo com o número de elétrons capturados (SUCUPIRA *et al.*, 2012), formando o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil, demonstrado na Figura 8.

O radical DPPH[•] possui uma absorção característica a 517 nm, é observado um decréscimo da intensidade de absorção, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante.

A atividade antioxidante avaliada pode ser expressa como coeficiente de inibição (IC₅₀), no tempo em que atingir a estabilidade determinada através de uma cinética, ou utilizando uma curva padrão de Trolox, um composto sintético hidrossolúvel estruturalmente e similar à Vitamina E, que é lipossolúvel (RUFINO *et al.*, 2007b).

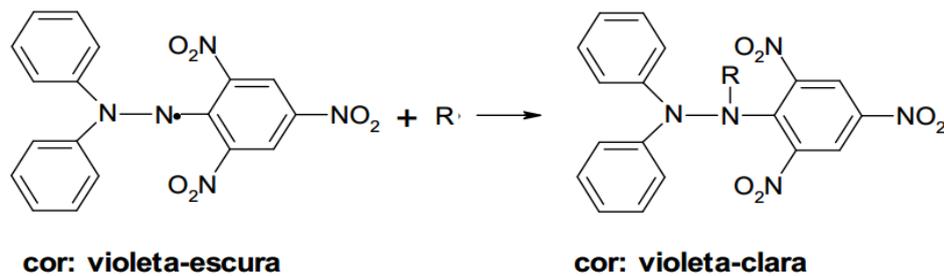


Figura 8: Estabilização do Radical DPPH.

Fonte: RUFINO *et al.*(2007b).

3.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}

Outro método largamente utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (RUFINO *et al.*, 2007a), e está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS^{•+} (SUCUPIRA *et al.*, 2012), conforme demonstrado na Figura 9.

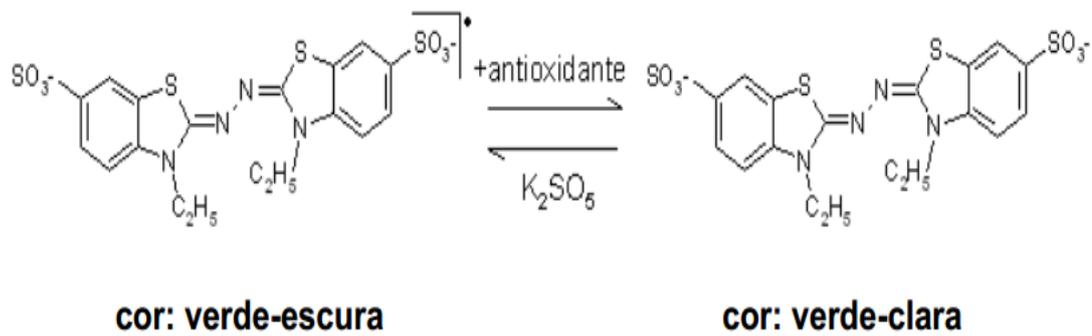


Figura 9: Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: RUFINO *et al.*, 2007.

Este método possui uma vantagem quando comparado ao método do DPPH, pois com o ABTS é possível medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, enquanto que com o DPPH só é possível a dissolução em meio orgânico (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

O radical ABTS deve ser gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS^{•+} (7 µmol) com 88 µL de persulfato de potássio 140mM. Esta solução deverá ser mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 16 h. A capacidade antioxidante da amostra é calculada em relação à atividade do antioxidante sintético Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), nas mesmas condições, e os resultados são expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (µmol TEAC/g de amostra).

3.5.3 Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

O método FRAP (*Ferric reduction antioxidant power*), consiste na redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe³⁺ - TPTZ), a ferroso tripiridiltriazina (Fe²⁺ TPTZ), em meio ácido, pelos agentes antioxidantes. Esta redução pode ser acompanhada pela coloração azul intensa apresentada pelo complexo de Fe²⁺, conforme exposto na Figura 10, com absorção na região de 593 nm.

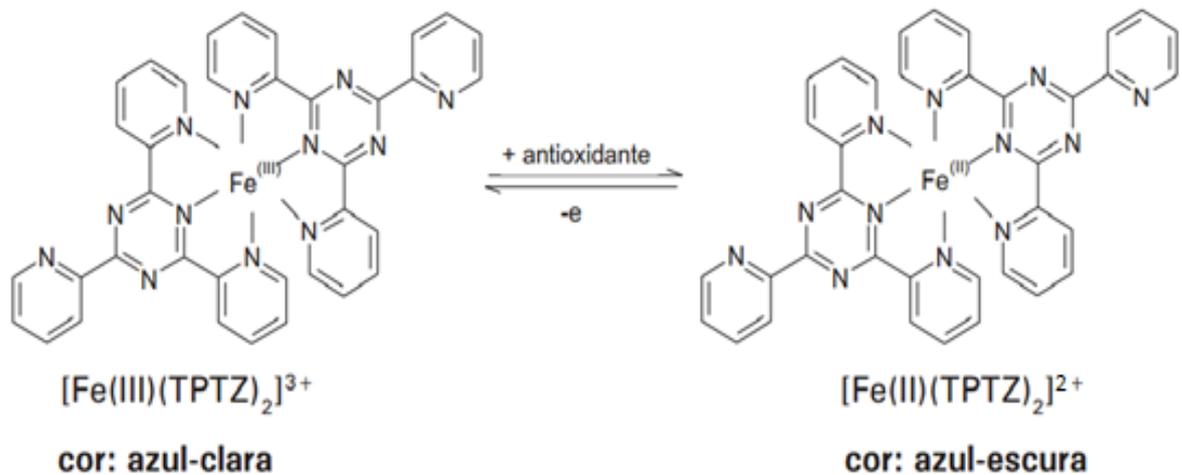


Figura 10: Redução do complexo TPTZ com Fe³⁺.

Fonte: RUFINO *et al.*(2006).

O reagente para esta análise deve ser preparado através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM) em solução aquosa.

As absorbâncias devem ser medidas após o tempo de 30 minutos e o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. Faz-se necessário utilizar uma curva de calibração desenvolvida com sulfato ferroso (200 – 2000 μM), e os resultados são expressos em μmol Fe²⁺/g de amostra.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

O material vegetal foi gentilmente cedido pela Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará.

4.2 TRATAMENTO DA AMOSTRA BRUTA DE *Quassia amara*

Foram separadas somente as folhas da amostra bruta de *Quassia amara*. Em seguida, o material vegetal foi seco em estufa a 40°C e triturado em moinho de facas. A descrição das atividades realizadas é demonstrada pelo fluxograma (Figura 11).

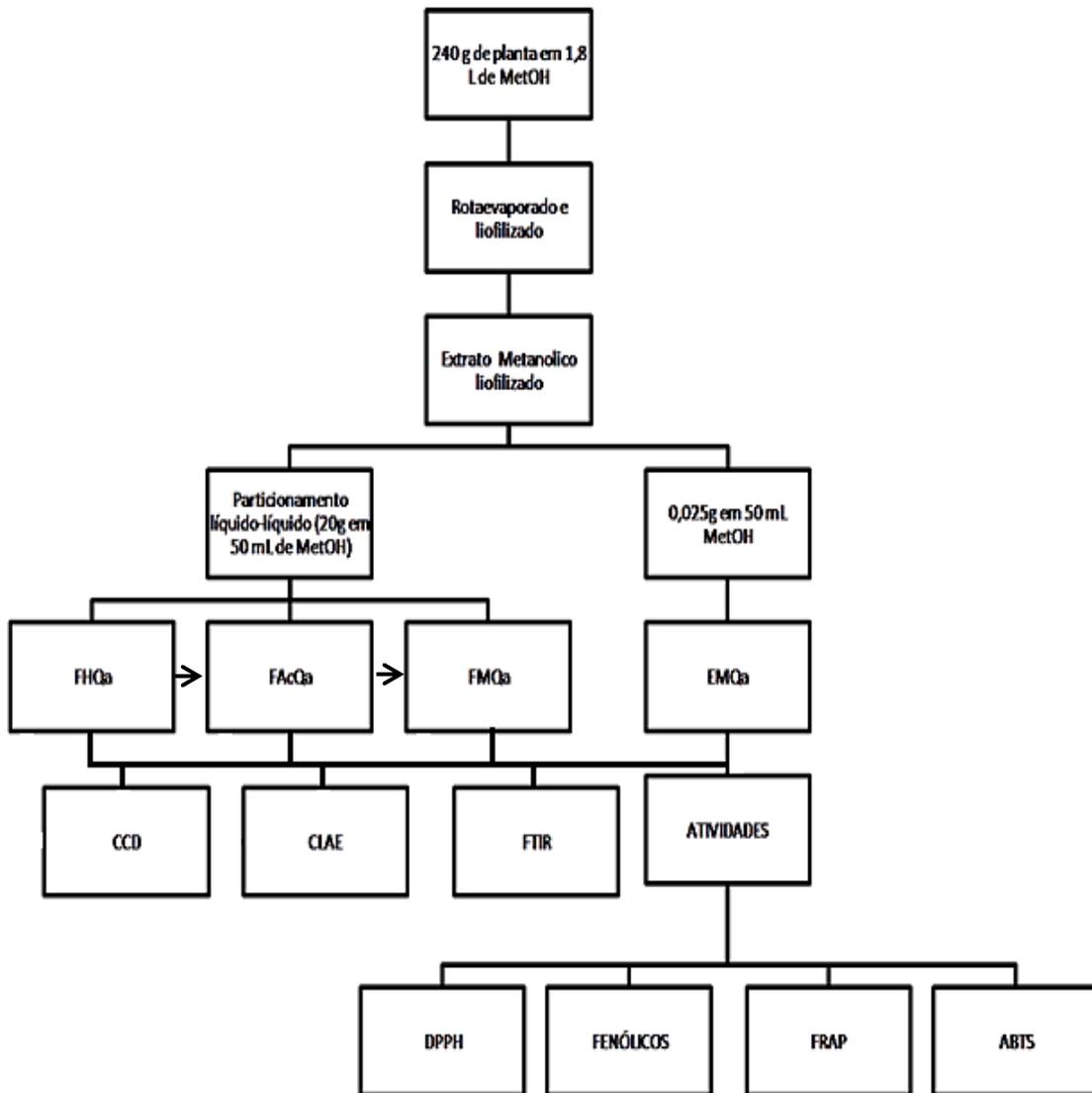


Figura 11: Fluxograma das atividades realizadas.

4.3 PREPARO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Quassia amara* (EMQa)

Para a obtenção do extrato metanólico da *Quassia amara* (EMQa), utilizou-se 240g da amostra triturada, conforme descrito item 4.2, e submetida a extração exaustiva sob maceração com metanol, durante uma semana. Em seguida, foi filtrado, obtendo-se o EMQa. O extrato foi concentrado utilizando o rotaevaporador (Fisatom® 802), a 40°C, e em seguida, liofilizado por 48 horas. Após o término, o resíduo liofilizado oriundo do EMQa (Figura 12), foi armazenado em freezer a -4°C, ao abrigo de luz.



Figura 12: Extrato Metanólico de *Quassia amara* liofilizado.

4.4 FRACIONAMENTO POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EMQa

O fracionamento do EMQa foi realizado pela técnica de extração líquido-líquido por partição em série, em funil de separação (Figura 13), utilizando-se 20g do extrato metanólico (EMQa), e redissolvido em 50 mL de metanol. Os solventes utilizados foram hexano, acetato de etila e metanol. Obtendo-se respectivamente, a fração hexânica (FHQa), fração acetato de etila (FACQa) e fração metanólica (FMQa). Após a evaporação total dos solventes, as frações foram pesadas e armazenadas.



Figura 13: Fracionamento líquido-líquido em funil de separação com o EMQa.

4.5 TRATAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO E DAS FRAÇÕES PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

Para a realização dos ensaios, o EMQa e as frações receberam o mesmo tratamento para se obter a mesma concentração. Foram utilizados 0,025g de cada amostra, e solubilizados em 50 mL de metanol, obtendo-se uma concentração de $5 \cdot 10^{-4} \text{ g.mL}^{-1}$, mostradas na Figura 14. A partir dessa concentração, dada como inicial, foram feitas as diluições necessárias para cada tipo de análise. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

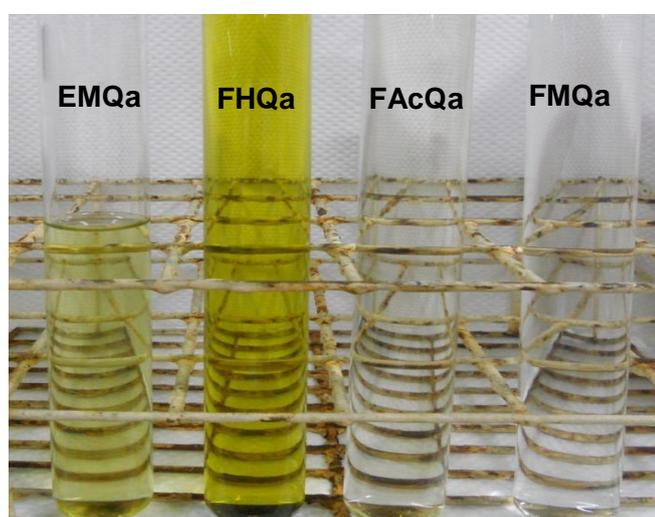


Figura 14: Extrato metanólico de *Quassia amara*, fração hexânica, fração acetato de etila e fração metanólica, respectivamente.

4.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O EMQa juntamente com suas frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD), em placas cobertas com sílica-gel F₂₅₄ Merck (5 cm x 20 cm x 0,25 mm de espessura) com indicador UV₂₅₄ utilizando Hexano/Acetato de etila (60:40) como fase móvel. Depois do desenvolvimento do cromatograma ascendente unidimensional, as placas foram reveladas com luz ultravioleta (254 nm) e vapor de iodo.

4.7 ANÁLISES REALIZADAS COM O EMQa E FRAÇÕES

O EMQa e suas frações foram submetidas as análises: Quantificação de compostos fenólicos totais, identificação de compostos fenólicos utilizando CLAE, caracterização espectroscópica das amostras a partir da técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). E a atividade antioxidante avaliada por três métodos distintos: sequestro do radical DPPH• expresso em IC₅₀ e μmol de Trolox.g⁻¹ de amostra, método ABTS^{•+} e método FRAP.

4.7.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

4.7.1.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais Método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton (1999). Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi transferida para tubos de ensaio sendo adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%). Após 5 minutos de repouso da mistura, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ (4 %). As soluções foram conservadas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente e após 2 horas foram realizadas leituras das absorvâncias a 740 nm. Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalente em ácido gálico.g⁻¹ de amostra (mg GAE.g⁻¹) e calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variam de 1,25 a 62,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

4.7.1.1 Identificação De Compostos Fenólicos Utilizando CLAE

Os compostos fenólicos foram identificados a partir da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a injeção foram realizadas novas solubilizações do extrato liofilizado e suas frações utilizando como solvente metanol de grau espectroscópico e água ultrapura, nas concentrações de 1% para o EMQa, FHQa e FMQa, e de 0,20% para a FacQa, em seguida foi filtrado através de um filtro 0,45 μm (Millipore) e injetado um volume de 10 μL em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de fluorescência com λ_{em} 280 nm, e utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos para a identificação dos compostos. A coluna analítica utilizada foi

de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) Varian, mantida a 30°C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol (solvente B) e água (solvente A), ambos acidificados com ácido acético a 0,1%, com eluição em modo gradiente. O gradiente iniciou com 5% de B até 7% de B em 7 minutos, 20% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 90% de B em 50 minutos e 95% de B em 55 minutos, mantendo esta concentração por mais 10 minutos, numa vazão de 1 mL por minuto. Foram examinados os seguintes padrões autênticos: ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico e resveratrol. O Cromatógrafo (Figura 15) pertence a Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Pato Branco.



Figura 15 Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE).

4.7.1.2 Caracterização Espectroscópica Das Amostras

Realizou-se a caracterização espectroscópica das amostras a partir da técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), utilizando o acessório de refletância atenuada universal - Universal Attenuated Total Reflectance (UATR), com polarizador ajustável, utilizado no infravermelho médio, o qual oferece uma análise de fácil execução e limpeza para a maioria das amostras, com um mínimo de preparação e alta reprodutibilidade (“Perkin Elmer” 2014).

Para a obtenção dos espectros de FTIR, as amostras foram solubilizadas em metanol, e aplicadas no acessório UATR. As medidas foram realizadas a partir de 32 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} , em um

espectrofotômetro da marca Perkin Elmer FT-IR *Spectrometer Frontier* (Figura 16), pertencente a Central de Análises da UTFPR, Campus Pato Branco.



Figura 16: Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier e acessório UATR.

4.7.2 Avaliação da Atividade Antioxidante do EMQa e Frações

4.7.2.1 Atividade de Sequestro do Radical DPPH expresso em EC_{50}

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams (1995). Para avaliação da atividade antioxidante, as amostras reagem com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. A mistura de reação é constituída da adição de 0,5 mL das amostras, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH (0,3 mM) em etanol. Mede-se a redução do radical DPPH por meio de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância, em espectrofotômetro a 517 nm, em tempo inicial e a cada 20 minutos até valores estáveis de absorção. Os resultados foram expressos como coeficiente de inibição (EC_{50}), ou seja, a quantidade de amostra necessária para reduzir o radical DPPH pela metade do inicial, no tempo em que atingiu a estabilidade determinada através de uma cinética de reação. A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada pela Equação (1):

$$\%Atividade\ antioxidante = 100 - \{[(A_{amostra} - A_{branco}) \times 100] / A_{controle}\} \quad Eq. (1)$$

Onde:

$A_{amostra}$: absorvância da solução com amostra e DPPH;

A_{branco} : absorvância da solução com amostra sem adição de DPPH;

$A_{controle}$: absorvância da solução referência (DPPH e etanol).

4.7.2.2 Atividade Antioxidante Expressa em Referencia ao Trolox

A atividade antioxidante expressa em referencia ao Trolox baseia-se no mesmo principio do método do coeficiente de inibição EC_{50} e/ou porcentagem de inibição, diferenciando-se apenas, pelo emprego de uma curva padrão de Trolox. Alíquotas de 500 μ L das diluições das amostras foram adicionadas á 3 mL de etanol P.A e à 300 μ L da solução de DPPH (0,5mM). O controle negativo foi conduzido nas mesmas condições, porém sem adição do DPPH e com um volume de 3,3 mL de etanol P.A. Em seguida, realizaram-se as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 517 nm no tempo zero e após 30 minutos de reação, sendo as amostras mantidas ao abrigo de luz. Construiu-se a curva padrão de Trolox nas seguintes concentrações 0,0075, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,0625 μ mol de trolox, o procedimento para análise seguiu o mesmo citado para as amostras. Os resultados foram expressos em expressos em μ mol de Trolox.g⁻¹ de amostra.

4.7.2.3 Atividade Antioxidante pelo Método ABTS^{•+}

A capacidade de sequestrar o radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico (ABTS^{•+}) foi determinada segundo o método descrito por Re *et al.*, 1999. O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS[•] (7 mM) com 88 μ L de persulfato de potássio (140mM), esta solução foi mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, diluiu-se a solução em etanol até obter absorvância no comprimento de onda de 700 a 734 nm. As amostras foram adicionadas a solução do ABTS^{•+} e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 minutos de reação. Como referência utilizou-se Trolox (6- hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um antioxidante

sintético equivalente à vitamina E, nas concentrações de 0,045 à 0,0015 μmol para a curva padrão. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ de amostra (TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.7.2.4 Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro – FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP), foi utilizada a metodologia descrita por Kukić *et al.* (2008). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl), e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mM), em solução aquosa. Uma alíquota de 100 μL das amostras foram adicionadas a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi desenvolvida com sulfato ferroso (200 a 2000 μM), e os resultados expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$ de amostra.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, os dados foram tratados utilizando a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando o teste Tukey a um grau de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o software OriginPro 8.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EMQa E FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).

A técnica de CCD é considerada um ótimo método para a triagem de substâncias desconhecidas devido a sua velocidade, confiabilidade, simplicidade, baixo custo e habilidade de gerar parâmetros como cor. Nesta técnica as

substâncias são separadas devido à diferença de polaridade entre elas, ou seja, o composto que interage mais com a fase estacionária (sílica gel) percorre uma distância menor do que o composto que tem maior interação pela fase móvel ou sistema solvente (LINI *et al.*, 2014).

Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas foram secas e reveladas. Esta última etapa consiste em tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra.

A Figura 16 mostra a cromatoplaça do EMQa e suas frações e a mesma revelada com UV (365 nm) e vapor de iodo.

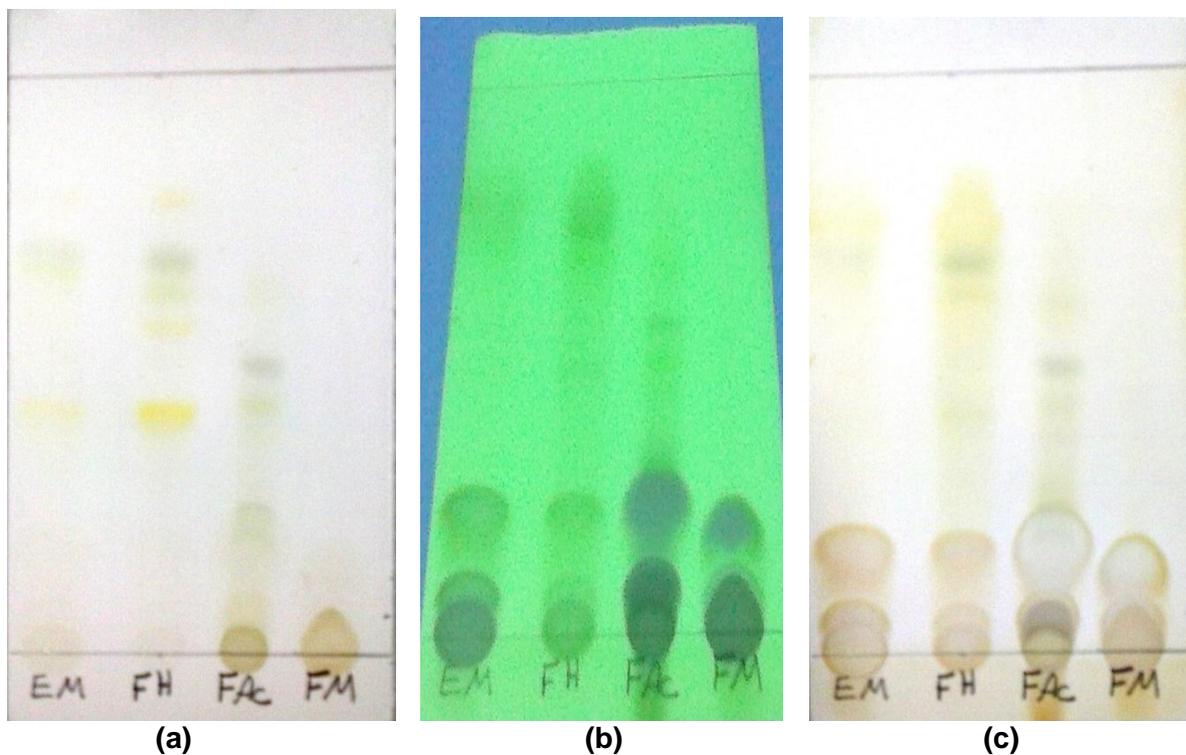


Figura 16: (a) Cromatograma do EMQa e suas frações FHQa, FAcQa e FMQa respectivamente. (b) Cromatograma revelado na luz UV (365 nm). (c) cromatograma revelado com vapor de iodo.

Pode-se visualizar através do cromatograma, que o extrato e as frações apresentam substâncias que são vistas somente na luz UV, devido ao fato de apresentarem fluorescência.

Segundo Choze (2004), a revelação com vapor de iodo aponta todos os compostos que possuem ligações duplas. A Figura 16 (c) mostra que a revelação com iodo possibilitou a visualização de vários compostos que não estavam visíveis.

A partir da CCD pode-se visualizar previamente a eficiência do fracionamento e conhecer o perfil cromatográfico do extrato e suas frações.

Conforme visto nas figuras, a FHQa e FAcQa apresentaram um maior número de substâncias e as mesmas ascenderam de forma semelhante ao extrato, somente a FMQa reteu os compostos na origem da placa, assim podemos concluir que os compostos presentes nestas frações possuem uma menor afinidade com a sílica, e a fase móvel foi capaz de arrastar mais os compostos, devido a presença de compostos apolares ser maior na FHQa e FAcQa do que na FMQa.

5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

5.2.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos por técnica espectroscópica UV-Vís

A quantificação de compostos fenólicos expressa um parâmetro de bioatividade da planta, sendo que os mesmos possuem características antioxidantes devido a sua estrutura e propriedades redutoras. Estas substâncias são de fundamental importância para a neutralização de radicais livres, desestimulam a oxidação celular, evitando tanto a iniciação como a propagação do processo oxidativo.

No presente estudo, a quantificação de compostos fenólicos foi realizada por meio de uma curva utilizando como padrão o ácido gálico nas concentrações de 1,25 a 62,5 μg , obtendo-se coeficiente de correlação igual a 0,997 sendo a mesma representada na Figura 17:

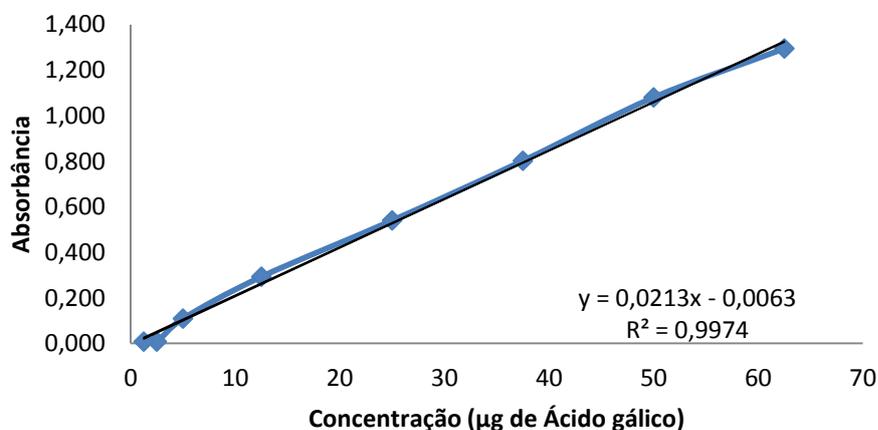


Figura 17: Gráfico da curva padrão de ácido gálico para quantificação de fenólicos.

Utilizando a equação da reta obtida pelo gráfico acima, pode-se estimar o teor de compostos fenólicos em relação ao ácido gálico das amostras analisadas. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Teores de compostos fenólicos presentes nas amostras analisadas.

Amostras	(mg EAG[*].g⁻¹)^{**}
EMQa	491,33 ^b ± 2,16
FHQa	86,12 ^d ± 0,28
FACQa	635,93 ^a ± 2,86
FMQa	384,28 ^c ± 1,08

* EAG: Equivalente em ácido gálico. **Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Verifica-se que, entre as amostras, houve diferença significativa de acordo com o Teste de Tukey a um nível de confiança de 95% (p<0,05), sendo a FAcQa a fração que apresentou maior valor (635,93 mg EAG.g⁻¹), mostrando-se superior ao EMQa e as demais frações.

Igualmente encontrado em Bora (2005) e Milani (2012), a fração acetato de etila, em diferentes tipos de amostras, apresentou valores superiores ao extrato e as demais frações, este comportamento pode ser atribuído a sua maior afinidade com os polifenóis. Também pode ser observado no presente trabalho e nos demais acima citados, que a fração hexânica apresentou menores valores em relação às outras frações devido suas características apolares que lhes conferem menor afinidade com os compostos fenólicos.

Pode-se avaliar a eficiência da extração por meio da diferença de teores de compostos fenólicos encontrados em Ferrari (2013) que realizou a extração com etanol e encontrou valores inferiores a extração realizada com metanol.

5.2.2 Identificação De Compostos Fenólicos Utilizando CLAE

Uma forma de confirmar se existe a presença de um composto em uma determinada amostra via cromatografia líquida de alta eficiência, é comparar o tempo de retenção do composto de interesse da amostra com padrões.

O uso da técnica analítica de cromatografia líquida de alta eficiência objetivou a identificação de compostos fenólicos nas frações derivadas do extrato através da comparação dos tempos de retenção dos compostos presentes nas amostras e dos padrões: ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferrúvico e resveratrol.

É possível observar na Tabela 2 a similaridade nos tempos de retenção das três frações com o ácido gálico e com o ácido cumárico, já o ácido ferrúvico somente na FMQa observou esta similaridade.

Tabela 2: Valores dos tempos de retenção dos padrões e das amostras.

	<i>TR</i> [*] (min)			
	Padrão	FHQA	FacQA	FMQa
Ácido gálico	9,05	8,67	8,44	8,39
Ácido vanílico	24,12	-	-	-
Ácido cafeico	24,75	-	-	-
Ácido cumárico	28,72	29,01	28,88	28,79
Ácido ferrúvico	29,73	-	-	29,73
Resveratrol	33,21	-	-	-

* Tempo de retenção em minutos.

Na Figura 18 está representado o cromatograma do mix de padrões autênticos de alguns compostos fenólicos que foram utilizados para a comparação com as frações FHQA (Figura 19), FacQa (Figura 20) e FMQa (Figura 21).

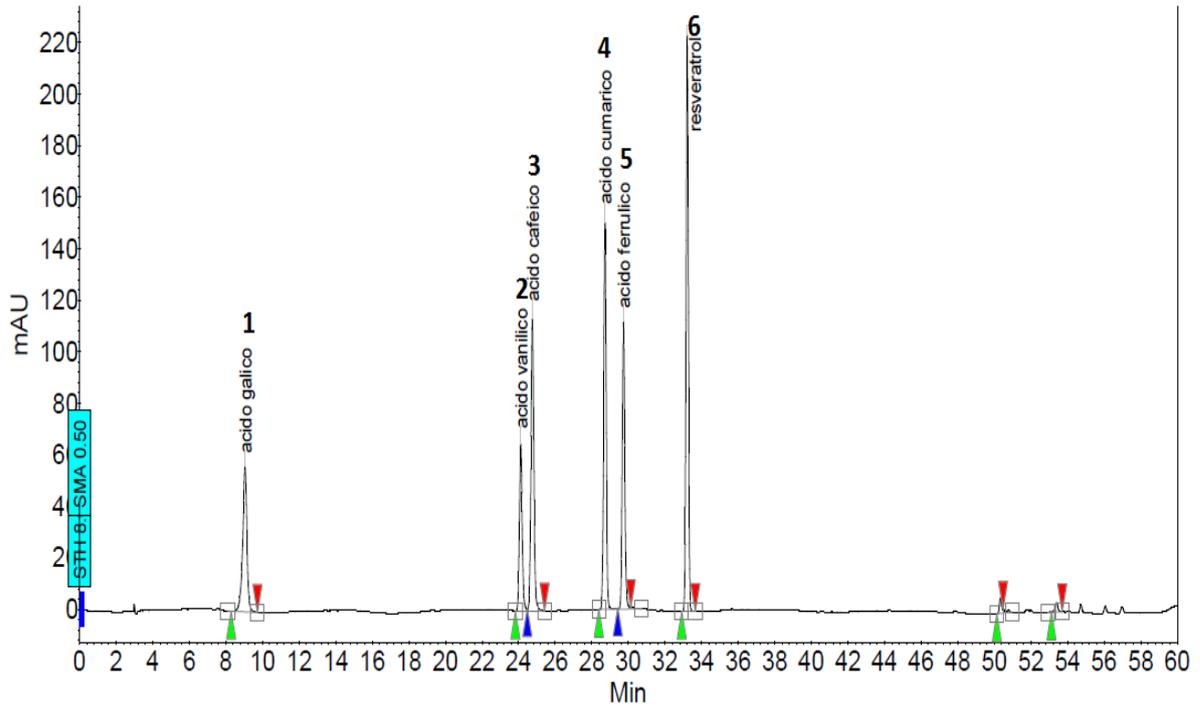


Figura 18 Cromatograma do mix de padrões autênticos utilizados.

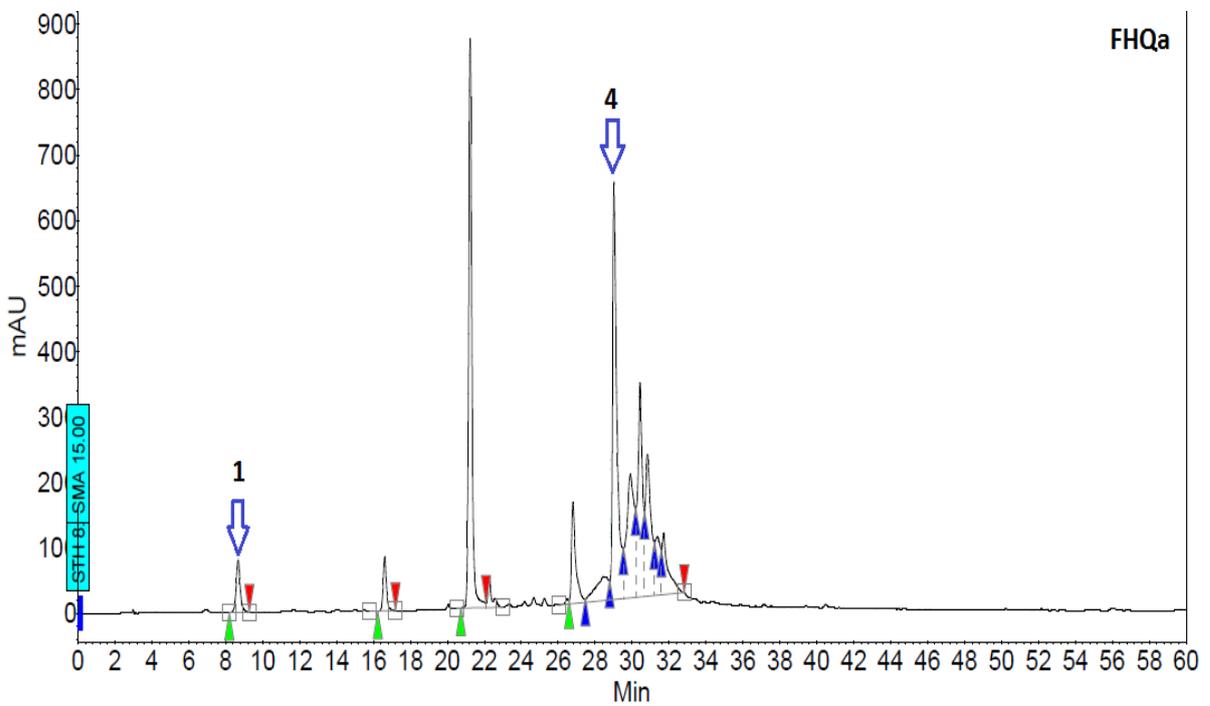


Figura 19: Cromatograma da amostra FHQa.

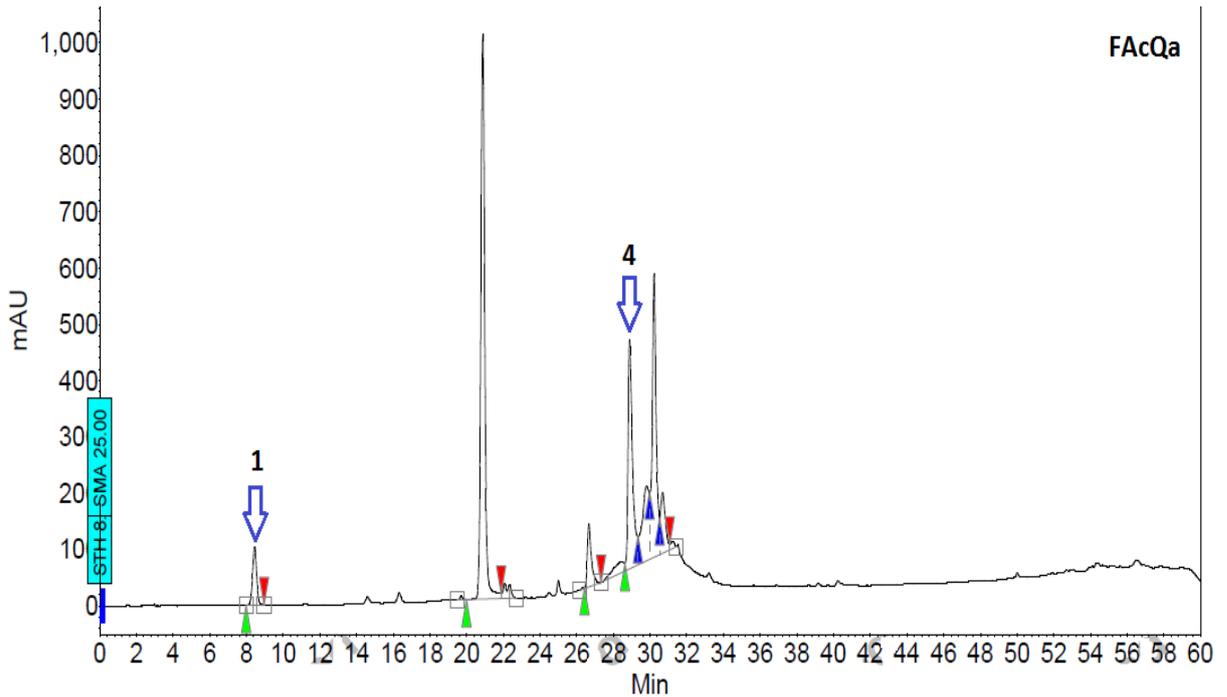


Figura 20: Cromatograma da amostra FAcQa.

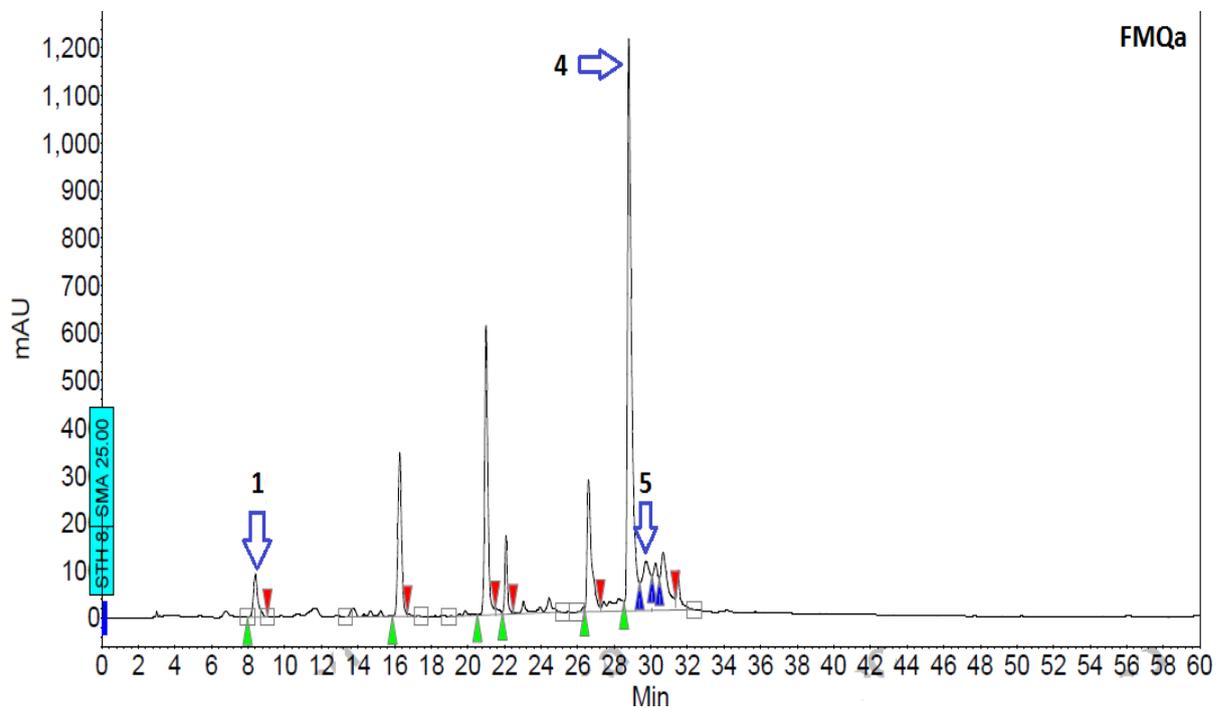


Figura 21: Cromatograma da amostra FMQa.

Os perfis obtidos por CLAE das amostras demonstraram similaridade. O cromatograma da fração FMQa permitiu a identificação de três compostos fenólicos, já nas frações FHQa e FAcQa foi possível identificar 2 destes compostos. Todas as

amostras apresentaram uma composição química com compostos de natureza fenólica.

Os resultados corroboram com o trabalho realizado por Ferrari (2013), onde no perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Quassia amara* foram encontrados os mesmos compostos, dentre outros.

5.2.3 Caracterização Espectroscópica Das Amostras

A técnica de FTIR tem sido usada largamente na identificação de vários compostos em matrizes diversas e complexas. Ela é também uma ótima ferramenta de controle de qualidade e caracterização de diversos produtos.

A análise espectroscópica de FTIR permite inferir sobre os grupos funcionais presentes nas amostras, que apesar de serem misturas complexas podemos identificar estes grupos devido aos picos característicos presentes. Na Figura 22 está apresentado os espectros obtidos para o EMQa e as frações FHQa, FAcQa e FMQa.

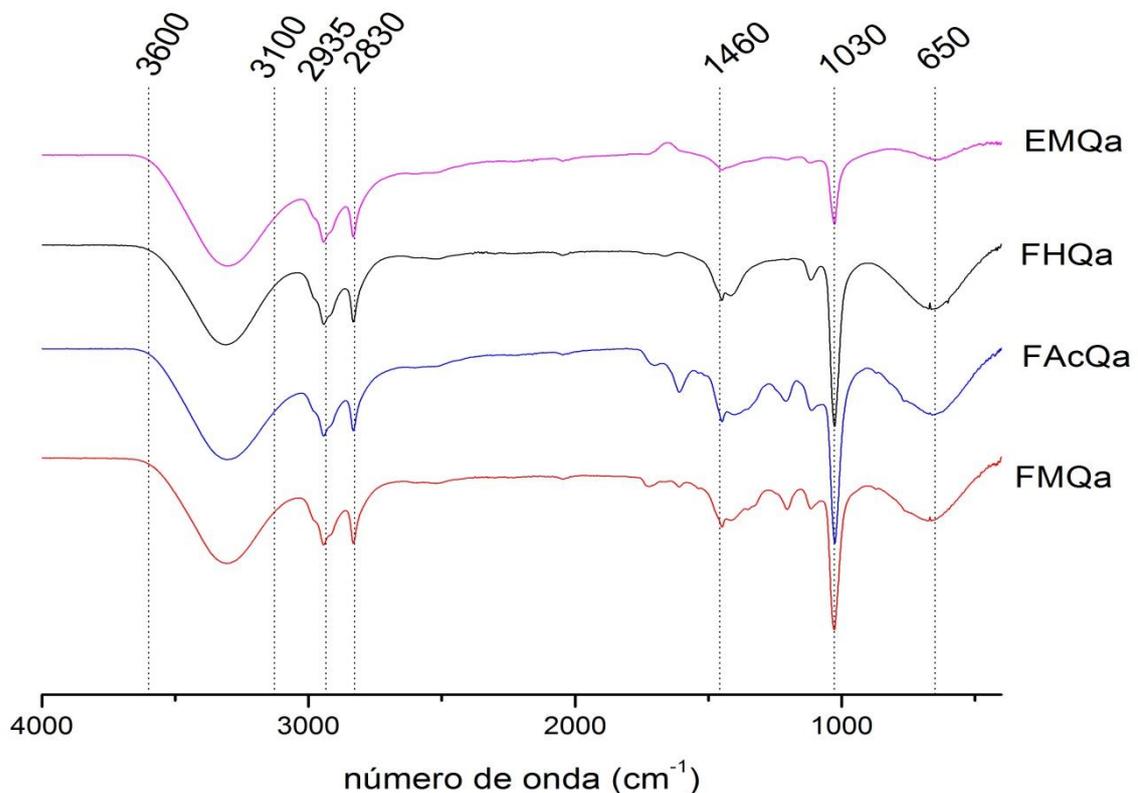


Figura 22: Espectro de FTIR das amostras.

Observa-se a presença de picos característicos de alguns grupos funcionais, conforme segue na Tabela 3.

Tabela 3: Atribuições aos picos obtidos no espectro de FTIR.

Região do IV* (cm ⁻¹)	Atribuições	Referências
3600-3100	Estiramento O-H do grupo (fenol)	(BARBOSA, 2007)
2935-2830	Estiramento C-H (aromático)	
1460	Estiramento C=C (aromático)	
1030	Estiramento C-O (álcool)	
650	Deformação C-H (aromático)	

*Infravermelho.

Como observado na tabela, todas as amostras apresentam, com intensidades semelhantes, a banda referente ao grupo O-H do fenol e estiramento C-H aromático, isto nos permite inferir que a extração e as partições extraíram vários compostos contendo estes grupos funcionais os quais corroboram com os elevados teores de fenólicos apresentados.

Os estiramentos em 1440 e 650 cm⁻¹, estiramento C=C e deformação C-H fora do plano, confirmam a presença de anéis aromáticos nas amostras.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E SUAS FRAÇÕES

O EMQa e suas frações foram submetidos aos seguintes ensaios antioxidantes: Sequestro do radical DPPH• expresso em IC₅₀ e μmol de Trolox.g⁻¹ de amostra, método ABTS•⁺ e método FRAP.

5.3.1 Atividade Antioxidante Pelo Método De Sequestro Do Radical DPPH• (2,2 Difenil-1-Picridrazina)

O sequestro do radical DPPH pela ação dos antioxidantes pode ser avaliado por dois diferentes métodos: coeficiente de inibição EC₅₀ e porcentagem de inibição, ou em referência ao padrão Trolox.

5.3.1.1 Coeficiente de inibição EC_{50} e porcentagem de inibição

O método da captura do radical DPPH expresso em EC_{50} baseia-se na medida da atividade antioxidante na redução do radical livre DPPH em presença de um antioxidante e expresso em Concentração Inibitória ou Equivalente Mínima do antioxidante para sequestrar 50% dos radicais iniciais (EC_{50}), e a porcentagem de inibição é calculada de acordo com a Equação (1).

Na Figura 23 está expresso o gráfico e a curva padrão correspondentes a amostra EMQa.

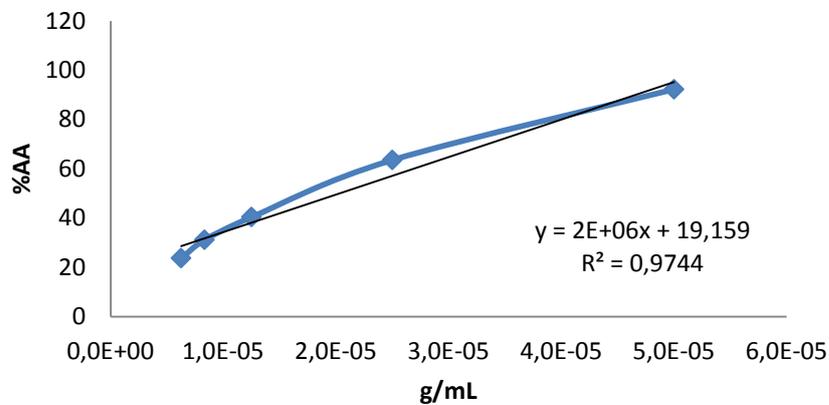


Figura 23: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC_{50} do EMQa.

Na Figura 24 está expresso o gráfico e a curva padrão correspondentes a amostra FHQa.

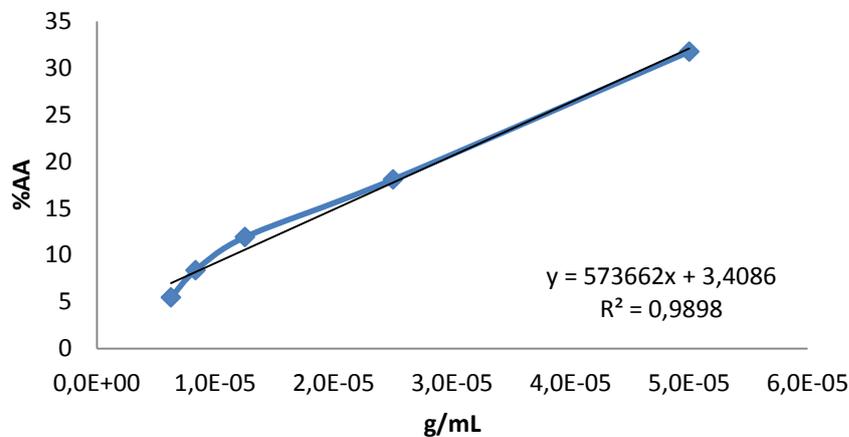


Figura 24: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC_{50} do FHQa.

Na Figura 25 está expresso o gráfico e a curva padrão correspondentes a amostra FAcQa.

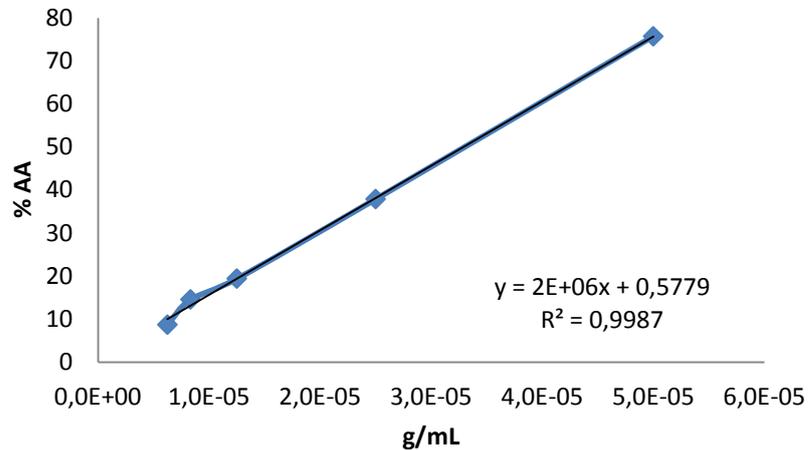


Figura 25: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC_{50} do FAcQa.

Na Figura 26 está expresso o gráfico e a curva padrão correspondentes a amostra FMQa.

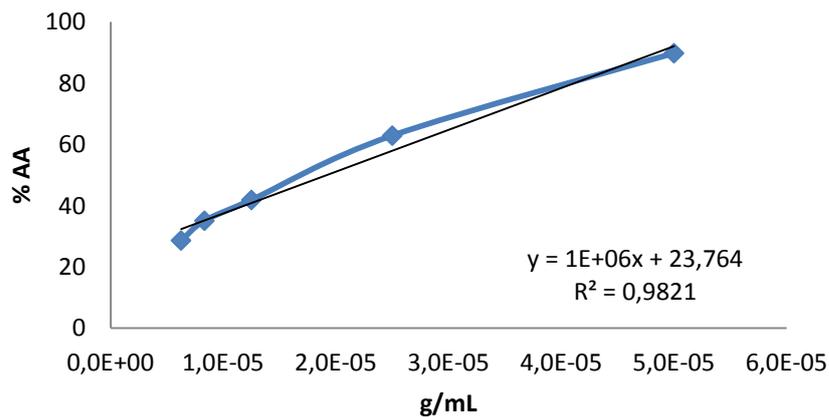


Figura 26: Gráfico contendo equação da reta para o cálculo de EC_{50} do FMQa.

Na Tabela 4 estão expressos os valores obtidos com a análise EC_{50} , através das equações de reta, para cada uma das amostras analisadas juntamente com os antioxidantes sintéticos BHT e BHA.

Tabela 4: Atividade de sequestro do radical DPPH expresso em EC₅₀.

Amostras	EC₅₀ (µg/mL) *
EMQa	15,42 ^a ± 1,17
FHQa	81,21 ^e ± 0,16
FAcQa	24,71 ^b ± 0,05
FMQa	26,23 ^c ± 0,25
BHT	114,67 ^f ± 0,15
BHA	72,246 ^d ± 0,18

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Mediante a aplicação do teste Tukey, pode-se verificar que todas as amostras diferem estatisticamente entre si.

Os resultados demonstraram que o EMQa apresentou ótimo resultado, tendo em vista que se mostrou mais eficaz que os dois antioxidantes sintéticos usados para comparação. No trabalho de Ferrari (2013), observa-se valor de atividade antioxidante (EC₅₀) inferior (88 µg/mL) para o extrato etanólico de *Quassia amara*, demonstrando melhor desempenho da extração metanólica, também constatada nas outras atividades.

As amostras testadas, exceto FHQa, apresentaram melhor atividade frente a inibição de 50% do radical DPPH quando comparado aos dois antioxidantes sintéticos.

5.3.1.2 Atividade antioxidante expressa em referencia ao Trolox

A quantificação da atividade antioxidante através do padrão Trolox possibilita determinar o quão promissor são os substratos em análise, uma vez que este composto desempenha funções antioxidantes semelhantes à vitamina E, porém apresenta a vantagem de ser hidrossolúvel.

Na Tabela 5, estão expressos os resultados encontrados por meio da atividade de sequestro do radical DPPH em referência ao padrão Trolox.

Tabela 5: Atividade de sequestro do radical DPPH em referência ao padrão Trolox.

Amostras	($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ de amostra)*
EMQa	27927,55 ^a \pm 197,86
FHQa	2488,28 ^{d,e} \pm 131,54
FAcQa	23135,63 ^b \pm 187,59
FMQa	11401,90 ^c \pm 105,73
BHA	4782,84 ^d \pm 69,34
BHT	4275,15 ^{d,e} \pm 72,98

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com o teste Tukey, observou-se que os antioxidantes sintéticos não apresentam diferença significativa entre si. A FHQa também não apresenta diferença significativa quando comparado aos dois antioxidantes sintéticos. Entre o extrato e as frações, todos apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH^{*}, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura e adquire coloração amarelada. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006), portanto pode-se concluir que o EMQa, que apresentou melhor desempenho nos testes com DPPH^{*}, possui uma concentração maior de agentes redutores que os demais.

Observa-se que a FAcQa também apresentou um bom desempenho frente ao radical, e as amostras testadas, exceto FHQa, apresentaram valores superiores aos dois antioxidantes sintéticos usados para comparação.

5.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{**}

O método ABTS está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS^{•+} provocando um decréscimo na absorvância, que é lida após 6 minutos a partir da mistura do radical com o antioxidante. Com esse método, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica presentes na amostra (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Os resultados foram calculados a partir da equação da reta de uma curva padrão (Figura 27) de Trolox e os resultados expressos em μmol de Trolox. g^{-1} de amostra.

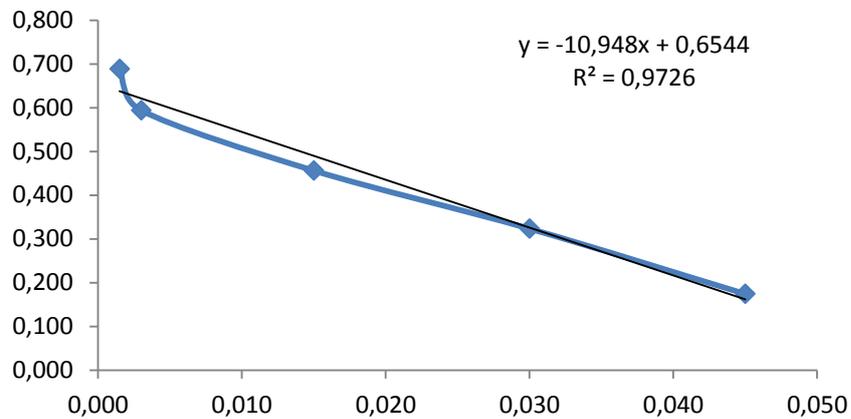


Figura 27: Gráfico contendo equação da reta utilizada para o método ABTS.

A equação da reta obtida a partir do gráfico da curva padrão, com coeficiente de correlação de 0,9726, é usada para calcular a atividade antioxidante das amostras expressas em TEAC.g^{-1} . A Tabela 6 apresenta os resultados referente a atividade antioxidante das amostras em comparação com os antioxidantes sintéticos BHT e BHA.

Tabela 6: Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS*[†]

Amostras	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$)*
EMQa	3935,12 ^d \pm 13,36
FHQa	487,13 ^f \pm 13,37
FACQa	4073,27 ^c \pm 16,81
FMQa	3278,04 ^e \pm 13,91
BHT	4277,33 ^b \pm 73,53
BHA	4743,04 ^a \pm 66,37

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pode-se visualizar na tabela que as amostras e os antioxidantes sintéticos diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, igualmente entre o extrato e suas frações. Assim como ocorreu na quantificação de fenólicos totais, a FACQa apresentou valores superiores ao EMQa, embora a diferença seja pouca é estatisticamente

significativa a $p < 0,05$. Assim como ocorreu em Silva (2011), onde a fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Bryophyllum pinnatum* também apresentou atividade antioxidante expressa em $\text{TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ superior ao extrato e as demais frações.

Comparado aos valores apresentados com os antioxidantes sintéticos (BHA e BHT), tanto o EMQa como a FAcQa apresentaram uma boa atividade frente ao radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

5.3.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP

As amostras também foram avaliadas pelo método de redução do ferro-FRAP, no qual é avaliada a capacidade de reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , caracterizada pela formação de um complexo de cor azul intenso (RUFINO *et al.*, 2006), uma vez que o Fe^{3+} age como catalisador de reações de oxidação.

O resultado da atividade antioxidante pela redução do ferro foi calculado a partir da equação da reta obtida pela curva padrão de sulfato ferroso (Figura 28).

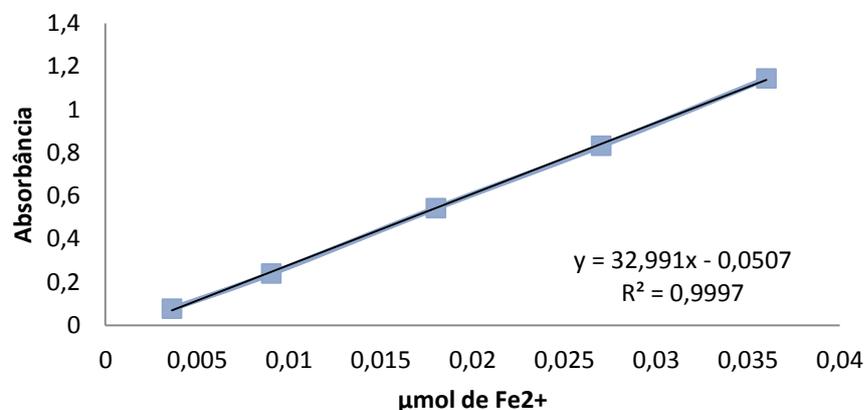


Figura 28: Gráfico contendo equação da reta utilizada para o método FRAP

A partir da equação da reta obtida no gráfico da curva padrão com coeficiente de correlação de 0,999, foi possível quantificar a concentração de Fe^{2+} presente em solução (Tabela 7). O resultado foi expresso em $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra.

Tabela 7- Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP).

Amostras	($\mu\text{mol de Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra)*
EMQa	3177,84 ^b \pm 3,03
FHQa	877,29 ^e \pm 18,86
FACQa	3781,03 ^a \pm 12,12
FMQa	2895,94 ^d \pm 28,29
BHA	3288,32 ^b \pm 240,45
BHT	2960,75 ^c \pm 76,67

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Através da análise estatística pelo teste de Tukey observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as amostras avaliadas.

A FAcQa, como na maioria das análises antioxidantes, se mostrou mais ativa, apresentando melhor resultado frente ao extrato, as demais frações e aos antioxidantes sintéticos testados.

Resultados semelhantes são encontrados em Brito (2014), onde as frações acetato de etila dos caules de *C. linearifolius* apresentaram valores superiores ao extrato etanólico e as demais frações.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, pode-se concluir que o fracionamento foi eficiente, pois os compostos foram devidamente separados de acordo com sua polaridade.

A FAcQa apresentou melhor atividade dentre as frações, demonstrando que atividade antioxidante pode estar relacionada a compostos com características de polaridade semelhantes a do acetato de etila.

A identificação por CLAE e caracterização por FTIR somente corroborou com os resultados encontrados na quantificação do teor de compostos fenólicos, demonstrando a veracidade do método utilizado.

Pode-se notar também, a partir dos resultados, a importância de avaliar a atividade antioxidante por diferentes métodos, pois não é possível afirmar qual metodologia é melhor aplicável que a outra, uma vez que todas possuem características próprias que se relacionam, possibilitando uma avaliação mais ampla das amostras quando realizadas em conjunto.

Por fim, a análise dos resultados obtidos neste trabalho mostra que a *Quassia amara* L. apresenta atividade antioxidante considerável, podendo ser utilizada como provável fonte de compostos antioxidantes naturais na indústria alimentícia e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Maria Clara. *Setor de fitomedicamentos deve faturar R\$ 400 milhões*. Disponível em: <http://ias2.epharmatecnologia.com.br/sa/sec/newsdtl_dtl?p_informa=5817>. Acesso em: 21 jul. 2014.
- ALMEIDA, Maria Mozarina Beserra *et al.* OCORRÊNCIA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE QUASSINÓIDES DA ÚLTIMA DÉCADA. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 935–951, 2007.
- AZOLINI, Fábila Cristina; TEDESCO, Adriana Maria; CARPES, Solange Teresinha; FERRAZ, Cristina; ALENCAR, Severino Matias de. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE PLANTAS USADAS COMO CHÁS. **Braz. J. Food Technol.**, v.9, n.3, p. 209-215. 2006.
- BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. **Viçosa, UFV**, p. 189, 2007.
- BATALHA, Mário Otávio *et al.* PLANTAS MEDICINAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO: SITUAÇÃO ATUAL, PERSPECTIVAS E ENTRAVES AO DESENVOLVIMENTO. **Floresta Estatístico**, v. 6, n. 15, p. 27–35, 2003.
- BISWAS, A.K.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R. Effect of spice mix and curry (*murraya koenigii*) leaf powder on the quality of raw meat and precooked chicken patties during refrigeration storage. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 278–292., 2006.
- BORA, Karina; *et al.* determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSONIACEAE. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p. 6–15, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M E; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm - Wiss Technol.**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRAVO, Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–33, nov. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838798>>.
- BRITO, Mateus Santos. *PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DOS CAULES DE Croton linearifolius (EUPHORBIACEAE)*. 2011. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.
- CHOZE, RAFAEL. *TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO EMPREGADAS NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS*. TCC. 2004. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
- CORRÊA, Cynthia Cândida; ALVES, Alexandre Florindo. PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA DE NEGÓCIOS: CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA. 2008, Rio Branco - Acre: **XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, 2008. p. 18.
- DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício *et al.* AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO SISTEMA β -CAROTENO / ÁCIDO LINOLÉICO E MÉTODO DE SEQÜESTRO

DE RADICAIS DPPH • 1. **Ciência e tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

EVANGELISTA, José. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2009. p. 652

FERRARI, Ana Paula. **ATIVIDADE ALELOPÁTICA, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO**. Dissertação, Mestrado 2013. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

FLEMMING, José Sidney. *Antioxidantes: importancia dos oleos essenciais e dos compostos fenólicos*. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/antioxidantes-importancia-dos-oleos-t397/141-p0.htm>>. Acesso em: 18 jul. 2014.

GILBERT, B; FAVORETO, R. Quassia amara L. (Simaroubaceae). **Revista Fitos**, v. 5, p. 4–19, 2010.

IGNOATO, Marlene Capelin. **Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico - Paraná**. 2012. Dissertação, Doutorado Universidade Estadual de Maringá, 2012.

JORGE, Neuza *et al.* COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE SEMENTES DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) EM ÓLEO DE SOJA. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 39, n. 4, p. 380–385, 2009.

KUKIĆ, Jelena *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 861–868, mar. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460700920X>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

KUSKOSKI, E Marta *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e tecnologia dos Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.

LIMA, J. F. *et al.* Avaliação de diferentes substratos na qualidade fisiológica de sementes de melão de caroá [*Sicana odorifera* (Vell .) Naudim]. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v. 12, n. 2, p. 163–167, 2010.

LINI, Renata Sano *et al.* Caracterização de fármacos por cromatografia em camada delgada. **revista brasileira de farmacologia**, v. 95, n. 1, p. 486–498, 2014.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Intituto Plantarum, 2008. p. 544

MARIUTTI, Lilian Regina Barros; BRAGAGNOLO, Neura. Antioxidantes Naturais da família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96–103, 2007.

MESSIAS, Karina Luiza da silva. Dossiê AntioxiDantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 6, p. 16–31, 2009.

MILANI, Liana Inês Guidolin *et al.* Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L .) cultivar Rama Forte. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 15, p. 118–124, 2012.

NUNOMURA, Rita de Cássia Saraiva *et al.* CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS GALHOS DE Simaba guianensis subesp. ecaudata (Cronquist). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2153–2158, 2012.

OLDONI, Tatiane Luiza Cadorin. *Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie Apis mellifera*. **Dissertação**, Mestrado. Universidade de São Paulo, 2007.

PARVEEN, Seema *et al.* A comprehensive evaluation of the reproductive toxicity of Quassia amara in male rats. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 17, n. 1, p. 45–50, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507657>>.

Perkin Elmer. Disponível em: <<http://www.perkinelmer.com.br/brochuras/PerkinElmerFrontier.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

PITARO, S. P.; FIORANI, L. V.; JORGE, N. Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 144, n. 4, p. 686–691, 2012.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EM ÓLEOS, GORDURAS E ALIMENTOS GORDUROSOS. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RE, ROBERTA *et al.* ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL. **Original Contribution**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

RUFINO, Maria do Socorro Moura *et al.* *Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. Comunicado Técnico 126, Embrapa*. [S.l: s.n.], 2007a.

RUFINO, Maria do Socorro Moura *et al.* *Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado Técnico 127, Embrapa*. [S.l: s.n.], 2007b.

RUFINO, Maria do Socorro Moura *et al.* *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Comunicado Técnico 128, Embrapa*. [S.l: s.n.], 2006.

SÁEZ, José Antonio LÓPEZ; SOTO, Josué PÉREZ. Etnofarmacología y actividad biológica de Quassia amara (Simaroubaceae): Estado de la cuestión. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, n. 5, p. 234–246, 2008.

Serre du Parc Phoenix , Nice (SDPPN) 5 Jun 2012 (276). Disponível em: <<http://violapinnata.blogspot.com.br/2012/10/quassia-amara-l-simaroubaceae-southern.html>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

SILVA, Romézio Alves Carvalho Da *et al.* AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL ABTS•+ DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DAS FOLHAS *Bryophyllum pinnatum*. 2011, Rio Branco - Acre: sbpcnet, 2011. p. 1–2.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–179, 1999.

SOUSA, Cleyton Marcos De M *et al.* FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CINCO PLANTAS MEDICINAIS. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SUCUPIRA, Natália Rocha *et al.* Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2012.

VIEGAS, Cláudio *et al.* OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.