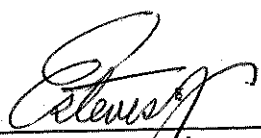


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Faucher

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Daniel Barrera Arellano e aprovada pela comissão julgadora em 18.10.85.
Campinas, 18 de outubro de 1985*



Presidente da Banca

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRA-
TOS LIOFILIZADOS DE PLANTAS BRA-
SILEIRAS.

18/85

DANIEL BARRERA ARELLANO
Engenheiro Bioquímico
Prof. Dr. WALTER ESTEVES
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

- . À minha avô Alícia (in memoriam).
- . Aos meus pais e irmãos.
- . À minha esposa Neusa e ao Anderson.

Com amor e gratidão

AGRADECIMENTOS

- . Ao professor Walter Esteves, pela orientação e apoio dedicados a este trabalho.
- . À professora Anita Marsaioli, pelas atenções e ensinamentos transmitidos.
- . À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP, pelas facilidades recebidas.
- . À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia" pelo apoio financeiro.
- . À Rhodia S.A. pelo fornecimento dos extratos e apoio técnico.
- . Aos Senhores Denis Requier, Robert Müller, Roberto Siqueira, Lawrence Nilsen e especialmente a Marcos Garcia pelas sugestões e apoio recebidos.
- . À Lilian Maria Bifano, pela valiosa ajuda na parte experimental.
- . Ao pessoal do Laboratório de Óleos e Gorduras: Dr. Leopold Hartman, Valentin Hartmann, Lireny, Roseli, Ana Maria, José Trujillo, Vilma e Alice.
- . Aos colegas do Curso: Cristina Garibay, Fernando Martinez, José Zazueta, Crispin Garcia, Enrique Ortega e Reinaldo Cruz.
- . À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação ABIA pela gentileza das cópias deste trabalho.
- . A todos e tantos que contribuíram durante minha estadia no Brasil.

CONTEÚDO

pág.

Índice de Tabelas	V
Índice de Figuras	VII
Resumo	XI
Summary	XII

INTRODUÇÃO	1
------------------	---

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
-----------------------------	---

Rancidez	3
----------------	---

Autooxidação	4
--------------------	---

Mecanismo da reação	4
---------------------------	---

Iniciação	6
-----------------	---

Propagação	7
------------------	---

Terminação	8
------------------	---

Degradação dos hidroperóxidos	9
-------------------------------------	---

Polimerização	11
---------------------	----

Medição da autooxidação	12
-------------------------------	----

Avaliação do estado oxidativo	12
-------------------------------------	----

Índice de peróxido	12
--------------------------	----

Teste do ácido tiobarbitúrico	13
-------------------------------------	----

Compostos carbonílicos totais	13
-------------------------------------	----

Índice TOTOX	14
--------------------	----

Compostos carbonílicos voláteis	14
---------------------------------------	----

Determinação de compostos oxirano	14
---	----

Determinação de dienos conjugados	14
---	----

Determinação de produtos conjugáveis e Índice oxodieno	15
---	----

Outros métodos	15
----------------------	----

Índices de estabilidade	16
Método de Schall ou "Oven Test".....	16
Método de oxigênio ativo ou "Swift Test"	16
Método de absorção de oxigênio	16
Rancimat	17
Inibição da autooxidação	17
Energia	18
Metais	18
Oxigênio	20
Inibidores da reação em cadeia	21
Sinergismo	21
Antioxidantes	22
Mecanismo da ação antioxidante.....	23
Compostos fenólicos como antioxidantes	25
Tocoferóis	27
Flavonóides	27
Atividade antioxidante dos flavonóides	30
Estrutura e atividade antioxidante	32
Taninos	35
MATERIAIS E MÉTODOS	36
Obtenção dos extratos	37
Seleção (1a. Etapa)	37
Critério de seleção	42
Confirmação (2a. Etapa)	42
Critério de escolha na confirmação	43
Isolamento e Purificação (3a. Etapa)	44

Cromatografia em camada delgada (CCD)	44
Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-prep).	48
Cromatografia em papel (CP)	49
Cromatografia em coluna (CC)	49
Cromatografia líquida de alta eficiência-preparati- va (CLAE-prep)	50
Cromatografia gasosa	50
Identificação (4a. Etapa)	51
Espectroscopia no ultravioleta (UV)	51
Espectroscopia no infravermelho (IR)	52
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ¹ H)	52
Espectrometria de Massa (EM)	52
Ponto de Fusão (PF)	53
Rotação Óptica	53
Teste de Fenóis	53
Determinação do conteúdo de taninos	53
Determinação da atividade antioxidante dos compostos isolados (5a. Etapa)	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
Seleção	55
Confirmação	79
Isolamento e purificação	90
Identificação	90
Cromatografia em camada delgada (Preliminar)	90
Avaliação de Taninos	91
<i>Cochlospermum insignis</i>	94

<i>Solanum viarum</i>	116
<i>Piptadenia macrocarpa</i>	121
<i>Mikania smilacina</i>	124
Determinação da capacidade antioxidante dos compostos isolados	126
CONCLUSÕES	129
BIBLIOGRAFIA	130

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

<u>TABELA 1</u> - Nome científico, família e nome comum das plantas estudadas	38
<u>TABELA 2</u> - Teste de capacidade antioxidante dos extratos no sistema modelo de β -caroteno-Ác. linoleico (1a. Etapa-Seleção)	71
<u>TABELA 3</u> - Comportamento dos extratos como antioxidantes, segundo sua forma de preparação, no sistema modelo de β -caroteno-ác. linoleico	76
<u>TABELA 4</u> - Teste de capacidade antioxidante de algumas substâncias fenólicas no sistema modelo de β -caroteno-ácido linoleico	78
<u>TABELA 5</u> - Teste da capacidade antioxidante dos extratos em óleo de soja a 110°C x 3 hs, 20 L/min ar. (2a. Etapa-Confirmação)	80
<u>TABELA 6</u> - Comportamento dos extratos como antioxidantes, segundo a forma de preparação, no sistema lipídico (óleo de soja)	85
<u>TABELA 7</u> - Teste de capacidade antioxidante de algumas substâncias fenólicas em óleo de soja ...	86
<u>TABELA 8</u> - Extratos que apresentaram alta atividade antioxidante nos dois sistemas testados (1a. e 2a. Etapas)	89

ÍNDICE DE TABELAS (Cont.)

	Pág.
<u>TABELA 9</u> - Avaliação do teor de taninos nos extratos selecionados para análise	92
<u>TABELA 10</u> - Máximos de absorvância (λ máx.) da fração 8' do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insignne</i>	104
<u>TABELA 11</u> - Teste de capacidade antioxidante num sistema lipídico (óleo de soja) das frações separadas dos extratos hidrolizados.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<u>FIGURA 1</u> - Esquema de trabalho utilizado pela Rhodia S.A. na obtenção dos extratos.....	41
<u>FIGURA 2</u> - Diagrama da hidrólise dos extratos.....	45
<u>FIGURA 3</u> - Diagrama da metilação dos extratos.....	46
<u>FIGURA 4</u> - Diagrama da acetilação dos extratos.....	47
<u>FIGURA 5</u> - Teste de atividade antioxidante dos extratos no sistema modelo de β -caroteno-ácido linoleico.....	56
<u>FIGURA 6</u> - Curva padrão para o cálculo do teor de taninos nos extratos.....	93
<u>FIGURA 7</u> - Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel das frações obtidas na CLAE do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i>	95
<u>FIGURA 8</u> - Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel das frações obtidas por CLAE das frações 5 e 6 do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i>	96
<u>FIGURA 9</u> - Espectro Ultravioleta (UV) em metanol da fração 3 (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i>	97
<u>FIGURA 10</u> - Espectro de Massa (EM) da fração 3 (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i>	99

ÍNDICE DE FIGURAS (Cont.)

Pág.

<u>FIGURA 11</u> - Espectro RMN' ¹ H da fração 3 (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i> em deuterometanol (CD ₃ OD).....	100
<u>FIGURA 12</u> - Espectro ultravioleta (UV) da fração 8' (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i> , em metanol; com metóxido de sódio.....	101
<u>FIGURA 13</u> - Espectro ultravioleta (UV) da fração 8' (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i> , em metanol; com AlCl ₃ ; com AlCl ₃ /HCl.....	102
<u>FIGURA 14</u> - Espectro ultravioleta (UV) da fração 8' (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i> , em metanol; com acetato de sódio; com acetato de sódio/ácido bórico.....	103
<u>FIGURA 15</u> - Espectro RMN' ¹ H da fração 8' (CLAE) do extrato hidrolizado (C) de <i>Cochlospermum insigne</i> em deuterometanol (CD ₃ OD).....	106
<u>FIGURA 16</u> - Espectro de massa (EM) da fração 8' (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i>	108
<u>FIGURA 17</u> - Padrão de fragmentação do di-hidrocampferol, baseado em MABRY & MARKHAM (1975).....	109

ÍNDICE DE FIGURAS (Cont.)

	Pág.
FIGURA 18 - Espectro RMN ¹ H da fração 8' (CLAE) silanizada do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i> em deuterocloroformio (CDCl ₃).....	110
FIGURA 19 - Espectro Ultravioleta (UV) da fração 8 (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i> em metanol.....	113
FIGURA 20 - Cromatografia gasosa da fração 8 (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de <i>Cochlospermum insigne</i>	114
FIGURA 21 - Espectro de massa dos componentes 4, 15, 16 e 17 da fração 8 da CLAE-preparativa das frações (7+8+9) do extrato hidrolizado (C) de <i>Cochlospermum insigne</i>	115
FIGURA 22 - Espectros Ultravioleta (UV) das frações 14 e 22 (coluna sílica gel) do extrato (A) hidrolizado de <i>Solanum viarum</i> em metanol.....	117
FIGURA 23 - Cromatografia de camada delgada (CDD) em sílica gel das frações obtidas por CLAE do extrato (A) hidrolizado de <i>Solanum viarum</i>	119
FIGURA 24 - Cromatografia de camada delgada (CDD) em sílica gel das frações obtidas na repurificação das frações 1-8 (CLAE) do extrato (A) hidrolizado de <i>Solanum viarum</i>	120

ÍNDICE DE FIGURAS (Cont.)

Pág.

<u>FIGURA 25</u> - Espectros Ultravioleta (UV) das frações 2, 3 e 4, obtidas por cromatografia em camada delgada preparativa do extrato (B) hidrolizado de <i>Piptadenia macrocar-</i> <i>pa</i> em metanol	123
---	-----

RESUMO

A atividade antioxidante de 140 extratos liofilizados, de diversas partes de 45 plantas brasileiras, foi avaliada em um sistema modelo aquoso de β -caroteno-ácido linoleico. Os extratos que apresentaram um efeito protetor mais destacado, em número de 42, foram testados em um sistema lipídico (óleo de soja).

Diversas técnicas cromatográficas (papel, camada delgada, coluna, líquida de alta eficiência e gasosa) foram empregadas na separação dos compostos presentes em 4 dos extratos mais ativos nos dois sistemas.

Frações obtidas de extratos de *Piptadenia macrocarpa* (folhas), *Mikania smilacina* (folhas), *Solanum viarum* (folhas e galhos) e *Cochlospermum insignae* (raiz) mostraram atividade antioxidante similar ou maior que o BHT (2,6 di-ter-butil p-cresol) no sistema lipídico. A identificação destas frações não foi conseguida por tratar-se de misturas com vários componentes.

Usando Espectroscopia Ultravioleta (UV), Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN¹H) e Espectrometria de Massa (EM) foi identificada a presença do flavonóide di-hidrocampferol (3, 4', 5, 7-tetra-hidroxi di-hidro flavonol) no extrato de raiz de *Cochlospermum insignae*. Esta substância não tem sido citada na família Cochlospermaceae.

O di-hidrocampferol, embora presente num extrato com alto poder antioxidante não mostrou atividade em óleo de soja, quando adicionado numa concentração de 0,1%.

SUMMARY

Antioxidant activity of lyophilized extracts of Brazilian plants.

The antioxidant activities of 140 lyophilized extracts of different parts of 45 Brazilian plants were evaluated in a model aqueous system containing β -carotene and linoleic acid. The 42 extracts that presented a marked protective effect were subsequently tested in a lipid system (soybean oil).

Different chromatographic techniques (paper, thin-layer, high performance liquid and gas-liquid) were used to separate the compounds present in four extracts which were most active in the two systems.

Fractions of extracts of *Piptadenia macrocarpa* (leaves), *Mikania smilacina* (leaves), *Solanum viarum* (leaves and branches) and *Cochlospermum insignne* (roots) showed antioxidant activity similar to or greater than that shown by BHT (2,6 di-ter-butyl-p-cresol) in the lipidic system. It was not possible to identify these fractions since each was a mixture of various components.

Using ultraviolet spectroscopy (UV), proton magnetic resonance (PMR) and mass spectrometry (MS), the presence of the flavonoid dihydrokaempferol (3, 4', 5, 7-tetrahydroxydihydroflavonol) was detected in the extract of the root of *Cochlospermum insignne*. This substance had not been previously reported in the family Cochlospermaceae.

Dihydrokaempferol, although present in an extract with a high antioxidant activity, showed no activity in soybean oil when added at a concentration of 0.1%.

INTRODUÇÃO

A principal dificuldade encontrada na preservação de óleos e gorduras ou alimentos que os contêm, está no desenvolvimento da rancidez. Na tentativa de resolver este problema, dadas as características desta deterioração, o uso de substâncias com propriedades antioxidantes tem recebido especial atenção.

Existe atualmente um crescente interesse por antioxidantes obtidos de fontes naturais por extração, purificação ou fracionamento, já que os compostos sintéticos comumente usados na indústria de alimentos vêm tendo restrições no seu uso, devido ao possível risco de toxidez que apresentam (CHAN *et alii*, 1977), além disso, estes compostos, no caso brasileiro, são todos importados.

Extratos de plantas exibem atividade antioxidante de variado grau, quando adicionados a óleos e gorduras e a produtos que apresentam gordura na sua formulação. Entre os compostos presentes nesses extratos os flavonóides são de especial interesse como substâncias de potencial atividade antioxidante devido a sua estrutura e propriedades (WHITTERN *et alii*, 1984).

O Brasil, segundo estimativas recentes, possui aproximadamente 120 mil espécies de vegetais nativos ou autóctones (MOURA, 1985), muitas das quais com propriedades medicinais e aromáticas, que poderiam ser pesquisadas como fontes de antioxidantes naturais.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a potência antioxidante de extratos de plantas brasileiras e identificar, se possível, os compostos responsáveis por esta atividade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A deterioração de alimentos é um fenômeno natural e um problema inevitável, tendo em vista que cada alimento tem sua vida útil característica e que depende em grande parte de sua composição, estrutura e condições de estocagem (DESROSIER & DESROSIER, 1977).

Em geral, nossos alimentos são misturas extremamente complexas de algumas centenas de espécies químicas, porém três grupos de substâncias orgânicas, carboidratos, lipídios e proteínas, junto com a água constituem a maior parte dos mesmos, chegando muitas vezes a formar mais de 99% de sua massa (BERK, 1976).

Os lipídios são constituintes essenciais da nutrição humana, pois são uma fonte concentrada de energia, formam parte de estruturas celulares, atuam como veículos de vitaminas lipossolúveis e são essenciais para muitas funções metabólicas. Além disso, eles contribuem para dar palatabilidade aos alimentos, são usados como transportador de calor e suas propriedades funcionais são aproveitadas na produção de muitos outros alimentos (LILLARD, 1983).

Os lipídios, porém, são componentes relativamente instáveis e muito cuidado deve ser tomado para protegê-los contra a deterioração. Eles estão sujeitos a várias ações que afetam sua qualidade e seu valor nutritivo. As mudanças mais importantes são as seguintes:

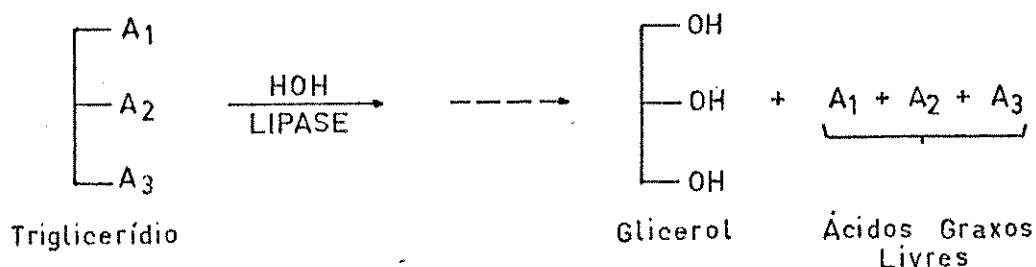
- a) deterioração em sementes, frutos ou em produtos de origem animal após colheita ou abate;
- b) mudanças químicas durante a refinação;

- c) mudanças químicas durante a hidrogenação e transesterificação;
- d) mudanças devidas ao uso repetido dos óleos para fritura, e
- e) formação de "off-flavour" ou rancidez durante a estocagem (SEHER, 1983).

Entre estas mudanças a última é sem dúvida a principal rota de deterioração e que ocasiona as maiores perdas econômicas, além de gerar produtos organolepticamente inaceitáveis para os consumidores, causa também outros efeitos degradativos, tais como perda de cor, destruição de vitaminas, polimerização e perda de valor nutritivo (SHERWIN, 1978).

Rancidez

A ocorrência de odores e sabores estranhos, geralmente descrita como rancidez em alimentos que contêm lipídios é uma observação muito comum. Estritamente falando nós devemos distinguir dois tipos de rancidez: rancidez hidrolítica e rancidez oxidativa (autooxidação). A primeira é devida à ação de enzimas (lipases) amplamente distribuídas nos alimentos e que catalizam a hidrólise dos triglicerídios, liberando ácidos graxos, que no caso destes possuem cadeia curta produzem o sabor acre e cheiro característicos de alimentos rançosos (BERK, 1976).

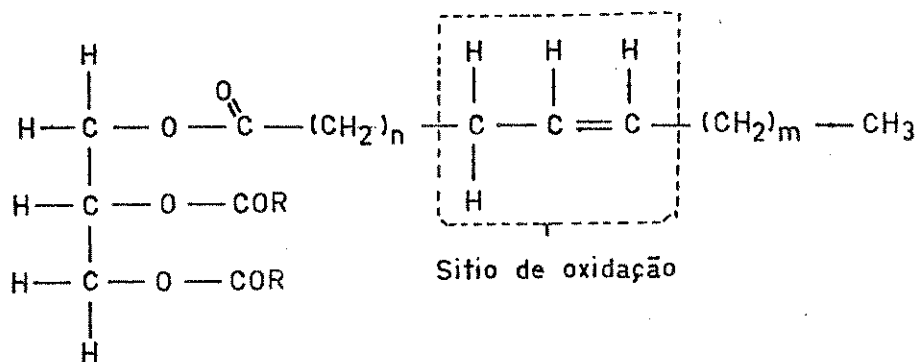


Este tipo de alteração é muito comum em alimentos como leite, sorvetes, manteiga, etc. Em alguns casos a rancidez hidrolítica é desejada, como em certos tipos de queijo, cujo sabor característico é devido à ação das lipases de fungos sobre os lipídios presentes.

O segundo tipo de rancidez é o mais importante como fonte de deterioração e portanto é de maior interesse compreender como esta alteração se desenvolve e, assim, poder eliminá-la ou minimizar seus efeitos (KORYCKA-DAHL & RICHARDSON, 1980).

Autoxidação

A autoxidação é definida como a oxidação espontânea de uma substância em contato com oxigênio (BERK, 1976). Em lipídios a oxidação é associada exclusivamente aos ácidos graxos insaturados, principalmente aqueles com mais de uma insaturação (CHAN *et alii*, 1982).



Molécula de triglicerídeo insaturado

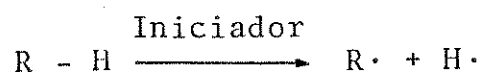
Mecanismo da reação

O fenômeno da autoxidação é explicado até hoje pelas hipóteses propostas por FARMER e colaboradores (1942 a,b, 1943,

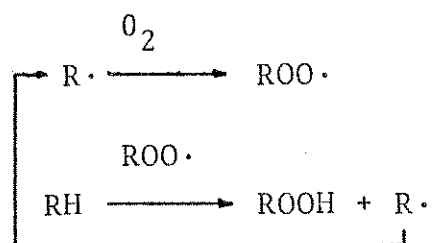
1946 a,b), BOLLAND e colaboradores (1945, 1946, 1948), que citam uma reação autocatalítica em cadeia, baseada na formação de radicais livres. Este mecanismo, porém, não explica todos os passos da reação, apesar de muitas observações confirmarem a hipótese (SEHER, 1983).

A reação consiste em 3 etapas, como segue:

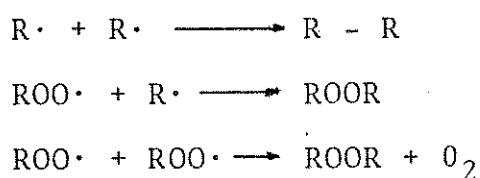
1. Iniciação



2. Propagação



3. Terminação



onde: RH = ácido graxo insaturado

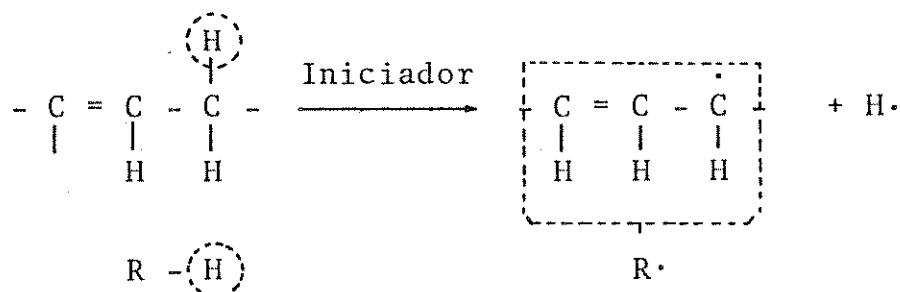
R· = radical lipídico

ROO· = radical peróxido

ROOH = hidroperóxido (LILLARD, 1983)

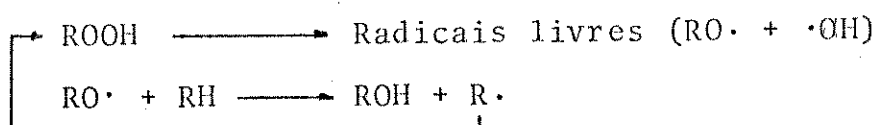
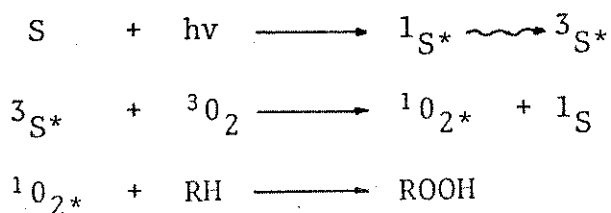
Iniciação

A autooxidação inicia-se com a abstração do átomo de hidrogênio vicinal à dupla ligação (hidrogênio alílico), formando-se radicais livres ($R\cdot$) altamente reativos (SCHULER, 1980).



A produção de radicais livres pode ser iniciada por dissociação térmica direta (termólise), por decomposição de peróxidos, por catálises com metais e por exposição à luz (fotólise) com ou sem intervenção de foto-sensibilizadores (FRANKEL, 1980).

Esta etapa de iniciação tem gerado inúmeras controvérsias e atualmente mecanismos que incluem as chamadas "espécies de oxigênio ativadas" tais como: oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidróxido ($\text{OH}\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3), adquirem maior importância (KORYCKA-DAHL & RICHARDSON, 1980), principalmente a primeira espécie (oxigênio singlet, $^1\text{O}_2$), cujo mecanismo proposto por RAWLS & Van SANTEN (1970) é descrito a seguir.



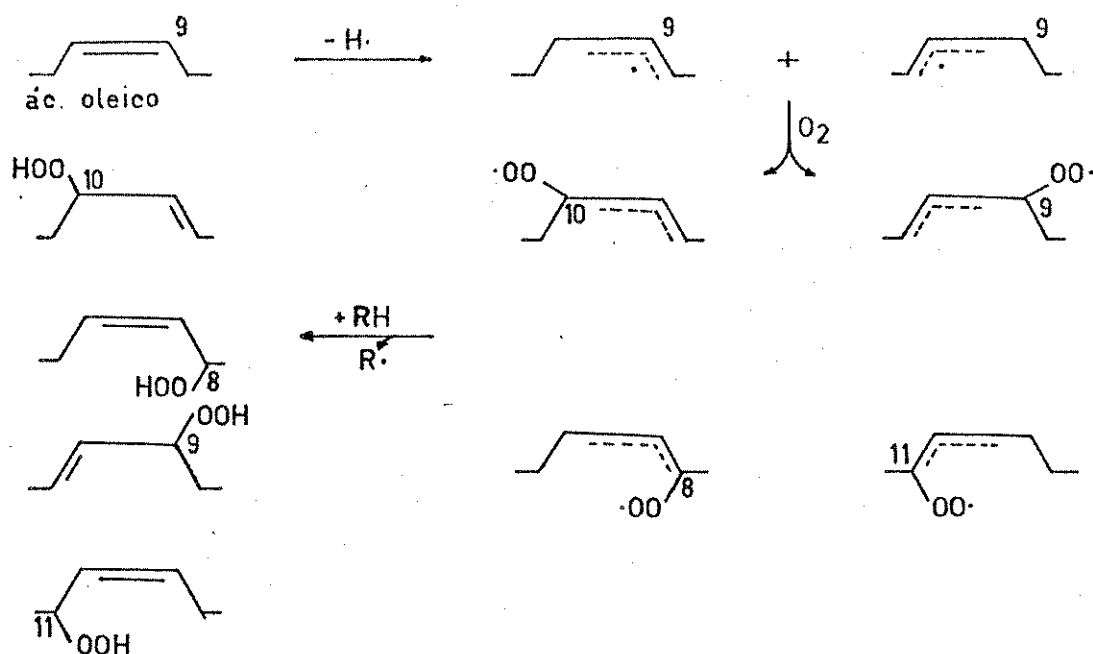
onde: S = sensibilizador em estado triplet
 1S = sensibilizador em estado singlet
 $^1S^*$ = sensibilizador em estado singlet excitado
 $^3S^*$ = sensibilizador em estado triplet excitado
 3O_2 = oxigênio triplet
 $^1O_2^*$ = oxigênio singlet excitado

A razão exposta é que a formação dos primeiros hidropéroxidos seria mais fácil, já que o oxigênio singlet reage 1450 vezes mais rápido que o oxigênio triplet. O sensibilizador requerido para esta conversão do oxigênio de triplet para singlet é encontrado normalmente em alimentos e consiste de compostos foto-sensíveis como clorofilas ou porfirinas (FRANKEL, 1980; LILLARD, 1983).

Propagação

Normalmente os radicais livres formados ($R\cdot$ e $H\cdot$) na primeira etapa (iniciação) poderiam desaparecer por recombinação (RH , RR , H_2) porém, em presença de oxigênio formam um radical peróxido ($ROO\cdot$), que reage com uma nova molécula do lipídio (RH) produzindo um hidroperóxido ($ROOH$) e um novo radical $R\cdot$ através do qual a reação é propagada (BERK, 1976).

A produção de hidroperóxidos ($ROOH$) depende da disponibilidade de hidrogênios alílicos para reagir com radicais peróxido ($ROO\cdot$), por exemplo no caso do ácido oleico, $C_{18}:1(9)$, se formariam 4 hidroperóxidos.



para o ácido linoleico, $C18:2(9,12)$, se produziria uma mistura dos hidroperóxidos 9 e 13 e no ácido linolênico, $C18:3(9,12,15)$, seriam formados os hidroperóxidos 9, 12, 13 e 16 (FRANKEL, 1980).

As proporções formadas destes hidroperóxidos a diferentes temperaturas foram determinadas por FRANKEL *et alii* (1977a,b,c) observando que no ácido linolênico são formados em maior proporção os hidroperóxidos 9 e 16.

Terminação

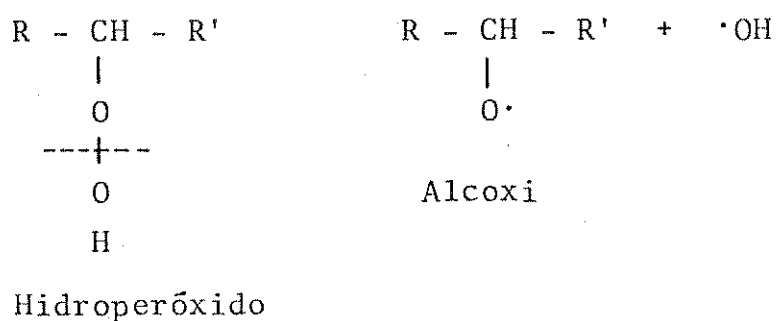
A reação termina quando os radicais livres se combinam entre si para formar produtos estáveis, que se acumulam no sistema (BERK, 1976).

Degradação dos hidroperóxidos

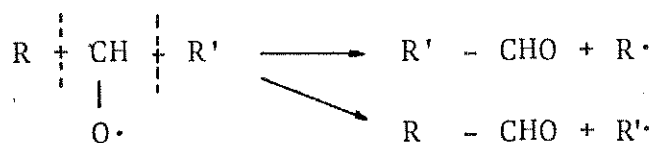
Os hidroperóxidos são importantes como produtos primários da oxidação, não são voláteis, não têm odor e nem sabor (LEA & SWOBADA, 1958; FRANKEL, 1983).

Os hidroperóxidos, também são degradados por um mecanismo de radicais livres, que aceleram a reação (LILLARD, 1983) e produzem muitos tipos de produtos secundários (KEENEY, 1962).

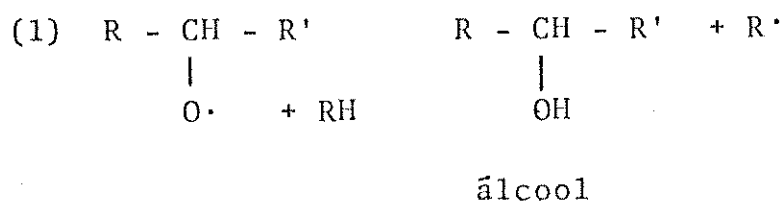
O primeiro passo desta decomposição é o rompimento do enlace oxigênio-oxigênio, gerando os radicais livres alcoxi ($\text{RO}\cdot$) e hidróxi ($\cdot\text{OH}$).

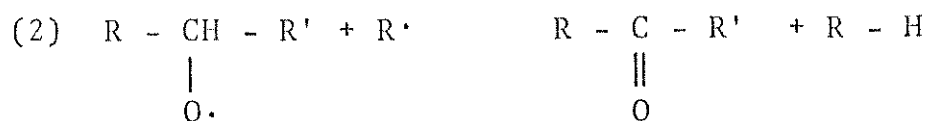


Onde o radical alcoxi pode ser rompido como segue:



Ou combinar-se com outros substratos (1), ou com outros radicais (2) ou ainda com outro radical alcooxi (3) (BELL *et alii*, 1951):





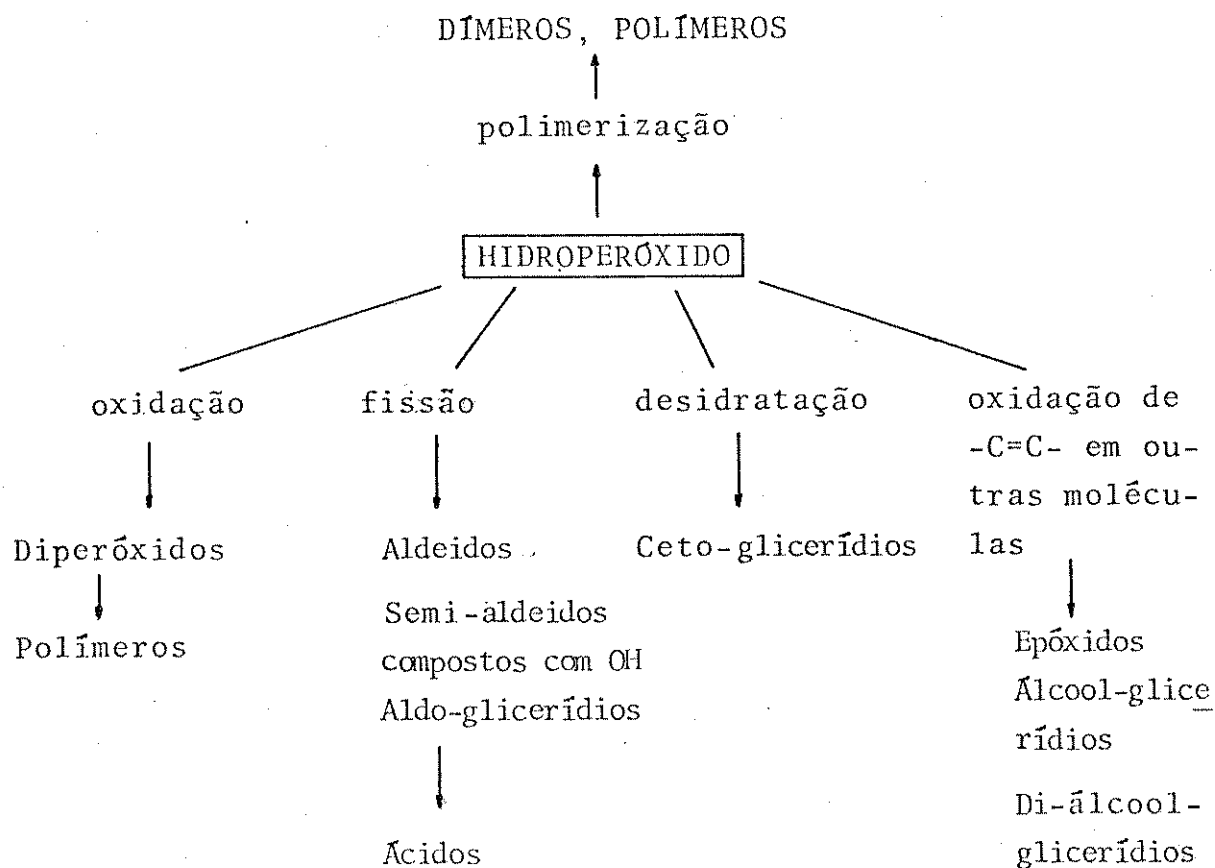
cetona



cetona álcool

Como se observa, a decomposição dos hidroperóxidos é acompanhada pela formação de um grande número de compostos, o que complica em muito qualquer intento de traçar caminhos definidos que expliquem realmente como se forma cada um dos compostos detectados num lipídio autoxidado (FRANKEL, 1983).

LEA (1962) propõe o seguinte esquema de algumas das rotas possíveis na decomposição dos hidroperóxidos:



É importante notar que a decomposição posterior dos produtos secundários gera entre outros produtos, as substâncias voláteis responsáveis pelo odor e sabor desagradáveis dos lipídios oxidados (FRANKEL, 1980, 1983). Compostos de altíssima potência, tais como o nonenal, é detectado em óleos vegetais hidrogenados por um painel de provadores em concentrações tão baixas como 0,005 ppm para odor e 0,0003 ppm para sabor, (KEPPLER *et alii*, 1965; 1967; FEENSTRA & MEIJBOOM, 1971). A origem destes produtos voláteis ainda é desconhecida, porém acredita-se que são formados na oxidação secundária de aldeídos insaturados (FRANKEL, 1962; LILLARD & DAY, 1964); por dimerização de hidroperóxidos (FRANKEL *et alii*, 1960; JOHNSTON *et alii*, 1961) ou por reações entre hidroperóxidos e compostos insaturados (SMOUSE & CHANG, 1967).

Polimerização

Uma outra consequência da autooxidação é a formação de compostos de alto peso molecular (polímeros), que afetam a qualidade dos óleos, aumentando a viscosidade e a eficiência do óleo como transportador de calor (LILLARD, 1983), além de reduzir o "flavor" e a estabilidade dos óleos (EVANS *et alii*, 1960; CROSSLEY & THOMAS, 1964; SMOUSE, 1979).

A formação de polímeros (lineares ou cíclicos) envolve enlaces carbono-carbono ou enlaces com oxigênio (PAULOSE & CHANG, 1973). Estas moléculas formadas não têm sido completamente identificadas já que sempre estão presentes como misturas complexas (FRANKEL, 1980).

Medição da autooxidação

Numerosos métodos são conhecidos para avaliar as condições de um óleo ou para predizer o tempo no qual apresentará condições de consumo (ODUMOSU *et alii*, 1979).

A análise sensorial é o método disponível mais sensível para determinar as condições reais de um óleo ou gordura, porém não é prático para análises de rotina, consequentemente têm sido desenvolvidos testes químicos e físicos, mais rápidos e reprodutíveis (GRAY, 1978).

Na escolha do método de medição, dois fatores são determinantes: sua sensibilidade às mudanças oxidativas e sua correlação com a análise subjetiva (ODUMOSU *et alii* 1979), este último fator é muitas vezes limitante, já que a correlação entre os métodos depende do tipo de óleo analisado, pois cada óleo tem seu próprio desenvolvimento oxidativo (SEHER, 1983).

Avaliação do estado oxidativo

Entre os métodos que envolvem a determinação quantitativa de um ou vários produtos da oxidação, pode-se citar um grande número, sendo os mais usados:

Índice de peróxido: (IP) que mede os produtos primários da oxidação (hidroperóxidos), que são referidos como peróxidos (GRAY, 1978), sendo determinados de várias maneiras: por iodometria (WHEELER, 1932; AOCS, 1973), por colorimetria (LIPS *et alii*, 1943) ou por combinação dos dois métodos (SWOBODA & LEA, 1958). Com este método, têm sido obtidos bons índices de correlação com ava-

liações sensoriais em óleo de soja hidrogenado, óleo de milho, *ba*nha (FIORITI *et alii*, 1974) e óleo de amendoim (ODUMOSU *et alii*, 1979).

Teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), que estima colorimetricamente o conteúdo de malonaldeído, um dos produtos secundários da reação, quando este se condensa com 2 moléculas de TBA, formando um pigmento vermelho (SINNHUBER *et alii*, 1958). A determinação pode ser feita de 2 maneiras, por destilação com arrastre de vapor (TARLADGIS *et alii*, 1960, 1962) ou por extração do pigmento (VYNCKE, 1970 a,b), ambas diretamente no alimento sem a extração do óleo ou gordura.

Altos valores de correlação entre este teste e análise sensorial foram encontrados em óleo de milho, algodão e soja (GRAY, 1978).

Mac DONALD *et alii* (1982) encontraram uma correlação significativa entre valores de IP e TBA num sistema modelo de ácido linoleico purificado.

Compostos Carbonílicos Totais (CCT), este método avalia os compostos carbonílicos formados na degradação dos hidroperóxidos (GRAY, 1978).

A avaliação destes compostos pode ser feita pela reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (HENICK *et alii*, 1954); com acetato de benzidina (HOLM *et alii*, 1957); com anisidina (p-metoxi anilina) (LIST *et alii*, 1974).

Estes últimos autores encontraram uma correlação alta entre valores do índice de anisidina (IA) e análises organolépticas para óleo de soja, enquanto que ODUMOSU *et alii* (1979) reportam baixa correlação em óleo de amendoim.

Índice TOTOX (IT) - Este índice é sugerido como a melhor forma de medição da oxidação, já que inclui a determinação de produtos primários e secundários da reação, o índice TOTOX é calculado da seguinte maneira: $IT = 2IP + IA$ (SHERWIN, 1978).

Compostos carbonílicos voláteis

Por este método são avaliados os compostos voláteis que realmente contribuem no "flavor" dos alimentos autoxidados, estes compostos de baixo peso molecular são recuperados com um sistema de destilação a vácuo (LEA & SWOBODA, 1962; GADDIS *et alii*, 1966).

Determinação de compostos Oxirano

Estes compostos que contêm um grupamento epoxi, são formados durante a autooxidação de materiais lipídicos, são determinados pela reação com halogênio em um solvente adequado (GRAY, 1978). O método de titulação com HBr foi adotado como método tentativo pela AOCS (1981).

Determinação de dienos conjugados

A oxidação dos ácidos graxos insaturados é acompanhada pelo incremento na absorção no ultravioleta devido a dienos (234 nm) e trienos (268 nm) conjugados, estas mudanças podem ser usadas como uma medida relativa da autooxidação (GRAY, 1978).

A absorção a 234 nm aumenta proporcionalmente a absorção do oxigênio e a formação de peróxidos (FARMER & SUTTON, 1943).

TSOUKALAS & GROSCH (1977) encontraram que a medição da absorção de dienos a 234 nm é um método muito sensível para detectar o começo da autooxidação.

Determinação de produtos conjugáveis (PC) e índice oxodieno (IO)

Neste método analítico os hidroperóxidos e compostos hidroxí e carbonílicos são convertidos em cromóforos conjugados por redução e desidratação e são expressos como PCO. A primeira reação com boroidreto de sódio resulta num decréscimo na absorção a 275 nm é conhecido como índice oxodieno (PARR & SWOBODA, 1976; FISHWICK & SWOBODA, 1977).

ODUMOSU *et alii* (1979) encontraram que o índice oxodieno (IO) tem alta correlação com análise sensorial enquanto os produtos conjugáveis da oxidação têm baixa em óleo de amendoim.

Outros métodos

Existem também métodos que usando técnicas de fluorescência (DILLARD & TAPPEL, 1973; TROMBLY & TAPPEL, 1975), polarografia (LEWIS *et alii*, 1949), cromatografia de gás (NAWAR & FAGERSON, 1962; SELKE *et alii*, 1970; JARVI *et alii*, 1971; WARNER *et alii*, 1974) e refratometria (ARYA *et alii*, 1969), são utilizados na determinação do estado oxidativo de óleos e gorduras ou produtos q os contêm.

Índices de estabilidade

Os métodos para determinação do tempo esperado que o lipídio resista à oxidação, são baseados em testes acelerados usando aquecimento com ou sem excesso de ar ou oxigênio, onde a fase de iniciação (Período de Indução, PI) é uma medida da resistência do óleo à autooxidação (SCHULER, 1980).

Os principais testes rápidos são descritos a seguir:

Método de Schaal ou "Oven test" - As amostras são estocadas a temperaturas elevadas em recipientes abertos. A medida do grau de oxidação é o índice peróxido (IP), o qual aumenta rapidamente no final da etapa de iniciação (SCHULER, 1980).

Método do oxigênio ativo (MOA) ou "Swift test" - Neste método uma corrente constante de oxigênio é passada através do óleo quente, e o índice de peróxido é medido a intervalos regulares, até alcançar um valor de 100 meq/kg, sendo tomado este tempo como o período de indução do óleo ou gordura (KING *et alii*, 1933; AOCS, 1973 método CD 12-57). A Companhia EASTMAN (1974), produtora de antioxidantes recomenda valores de 20 meq/kg para gorduras animais e 70 meq/kg para óleos vegetais.

Método de absorção de oxigênio - Neste método a amostra é colocada num sistema fechado com uma pressão de oxigênio, o progresso da oxidação é medido pelas mudanças na pressão de oxigênio. Diversos aparelhos têm sido usados para esta medição, tais como:

Aparelho de Barcroft - Warburg (NAGY *et alii*, 1944),
Fira-Astell (BERGER, 1971).

PAUL & ROYLANCE (1962) compararam os valores do tempo de indução determinado pelos métodos de absorção de oxigênio e "SWIFT test" e não encontraram nenhuma correlação com testes organolépticos ou de estocagem normal a temperatura ambiente.

Rancimat

Neste método a estabilidade de óleos e gorduras é determinada pela captura dos produtos voláteis da reação em água na qual é medida a condutividade elétrica (FRANK *et alii*, 1982).

O desenvolvimento da reação é acompanhado pelo aumento na condutividade na água, que resulta num gráfico, onde pode-se calcular o período de indução de cada óleo ou gordura testado.

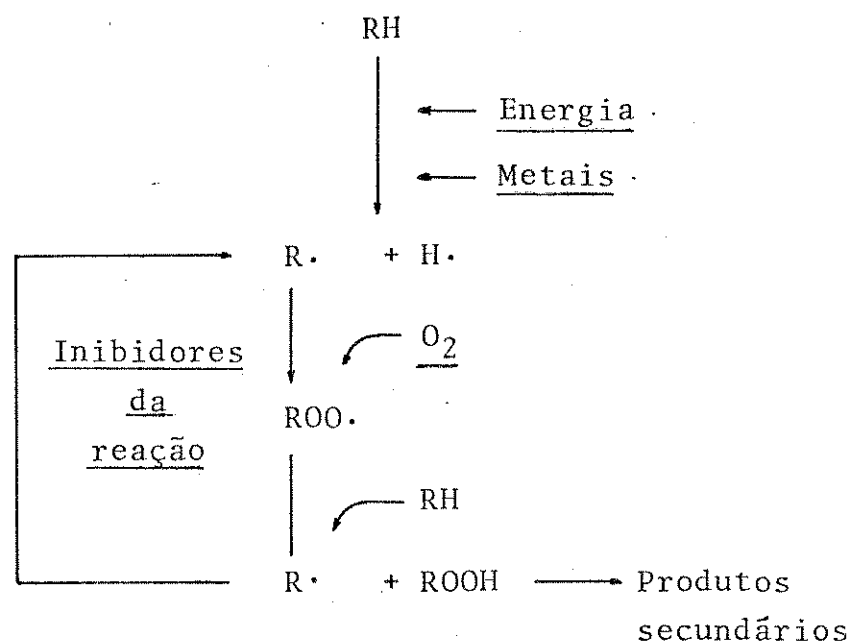
O aparelho Rancimat 617 é fabricado pela Metrohm, consta de 4 sistemas principais: aquecimento, fornecimento e acondicionamento de ar, medição da condutividade e registro.

As condições da reação para medição da estabilidade são determinadas pelos parâmetros: temperatura, fluxo de ar e quantidade de amostra (FRANK *et alii*, 1982).

Inibição da autoxidação

O problema da inibição ou retardamento do processo de oxidação de óleos e gorduras é um dos maiores na indústria de alimentos e muitos pesquisadores têm se concentrado na sua solução (EMANUEL & LYASKOVSKAYA, 1967).

No diagrama seguinte estão sumarizadas as fases de iniciação e propagação, indicando os principais pontos onde é possível alterar a velocidade da reação (SCHULER, 1980).



Energia

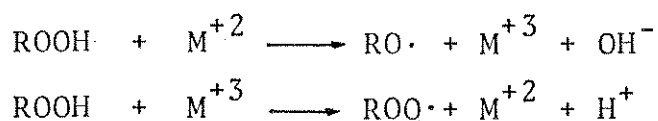
A energia necessária para a geração dos primeiros radicais livres pode ser fornecida na forma de luz (fotólise), principalmente ultravioleta, com ou sem foto-sensibilizadores, calor (termólise) (FRANKEL, 1980) ou radiações ionizantes (BERK, 1976).

Portanto, a primeira medida preventiva com qualquer produto que contenha lipídios é a estocagem em lugares escuros e a baixas temperaturas (SCHULER, 1980).

Metais

A autoxidação, também pode ser catalisada por metais (FRANKEL, 1980) que parecem agir principalmente via decomposição

de hidroperóxidos, (EMANUEL & LYASKOVSKAYA, 1967) atuando como doadores de elétrons e produzindo radicais livres (INGOLD, 1962).



Existe também evidência de que os metais podem estar envolvidos na formação de oxigênio singlet o qual poderia iniciar a reação (AURAND *et alii*, 1977).

Estudos da atividade catalítica de metais têm mostrado que cobre, ferro (EVANS *et alii*, 1951), chumbo, manganês, cobalto (ZIELS *et alii*, 1945), níquel e estanho (MORRIS *et alii*, 1950) aceleram a oxidação de óleos e gorduras.

Para evitar este efeito catalizador, equipamentos ou materiais de embalagem que contenham estes elementos não devem ser usados (SCHULER, 1980).

Os metais também podem ser inativados por agentes complexantes (quelantes) como: Ácido cítrico, ácido tartárico ou seus sais e esteres, ácido fosfórico, lecitina, EDTA e açúcares. (DUTTON *et alii*, 1948; SCHWAB *et alii*, 1953; LUNDE *et alii*, 1976).

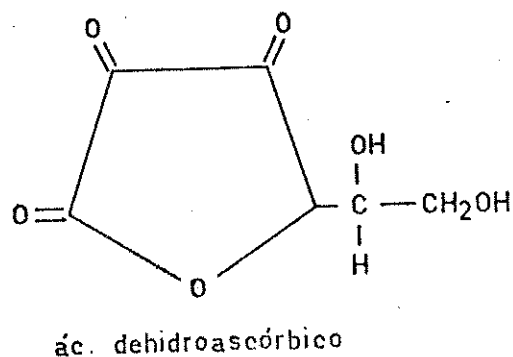
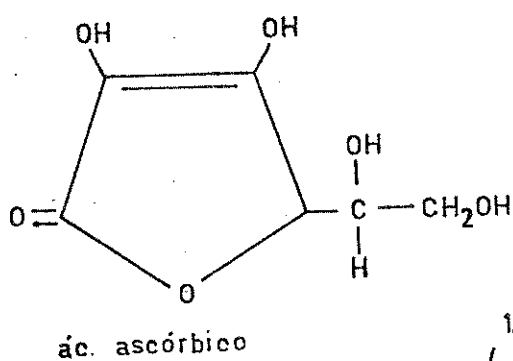
Aparentemente a catálise por metais, ocorre na forma de complexos pró-oxidantes com oxigênio ou hidroperóxidos (BLACK, 1978) e estes complexos devem ser destruídos pelo calor para que o agente quelante seja efetivo (COONEY *et alii*, 1958).

Os alimentos, também, contêm substâncias como clorofilas e porfirinas que incluem metais em suas moléculas e que possuem um efeito catalítico (BERK, 1976). Estas substâncias nem sempre podem ser eliminadas sem descaracterizar o alimento.

Oxigênio

A velocidade da reação de autoxidação é diretamente proporcional à pressão de oxigênio no meio, e a exclusão do ar (embalagem a vácuo ou em atmosfera de nitrogênio, uso de materiais de embalagem com baixa permeabilidade ao oxigênio) é uma prática comum para retardar a deterioração oxidativa (BERK, 1976).

O oxigênio também pode ser convertido à sua forma inativa por sequestrantes ("scavengers") tais como ácido ascórbico e seus ésteres de ácidos graxos (ascorbil palmitato ou estearato) (SCHULER, 1980).



Inibidores de reação em cadeia

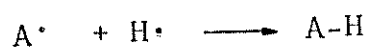
A autoxidação de lipídios pode ser inibida ou retardada pela adição de pequenas quantidades de substâncias que se combinem como os radicais livres, que iniciam e propagam a reação, para formar produtos inertes (FRANKEL, 1980). Estes compostos que interrompem a reação são chamados antioxidantes (SCHULER, 1980).

Geralmente os inibidores da reação em cadeia junto com os sequestrantes de oxigênio são chamados antioxidantes primários (BERK, 1976), e os quelantes de metais e qualquer substância com pouca ou nenhuma atividade, mas que são capazes de aumentar a atividade dos antioxidantes primários são chamados agentes sinérgicos (SHERWIN, 1976; SCHULER, 1980).

Sinergismo

O termo sinérgico é definido como a atividade antioxidante não aditiva de 2 compostos presentes no mesmo substrato (EMANUEL & LYASKOVSKAYA, 1967).

A mais simples forma de sinérgico entre ácidos e antioxidantes é explicada pela atuação dos ácidos como doadores de prótons (CALKINS, 1947), reduzindo os antioxidantes oxidados previamente e restabelecendo sua atividade (STUCKEY, 1962).



Um outro efeito sinérgico é normalmente encontrado quando são usadas misturas de dois antioxidantes primários, resultando numa maior atividade antioxidante que aquela mostrada pelos

antioxidantes isolados (AHMAD *at alii*, 1983). Por esta razão é comum o uso de misturas de antioxidantes e sinergistas nas formulações antioxidantes industriais (EASTMAN, 1974).

ANTIOXIDANTES

HIGGINS & BLACK (1944) resumizam os requerimentos para um antioxidante como segue: O composto deve retardar o desenvolvimento do processo da autoxidação, no caso de óleos e gorduras, pelo menos por um ano a 24-27°C em embalagens não lacradas; deve ser solúvel no óleo; não deve conferir nenhum odor, "flavour" ou cor ao produto; o aquecimento do material não pode causar nenhuma mudança química; deve permanecer ativo após o uso do óleo ou gordura; e sua produção em grande escala deve ser fácil e barata.

É evidente, que além destas características, o composto não pode ser tóxico nas quantidades usadas ou combinar-se com outros compostos do sistema para produzir substâncias tóxicas.

A potência antioxidante de um grande número de compostos tem sido avaliada e está documentada extensivamente na literatura (LUNDBERG, 1961, 1962; SCOTT, 1965; EMANUEL & LYASKOVSKAYA, 1967; STUCKEY, 1972; SHERWIN, 1976). Entre estas substâncias, encontra-se compostos naturais e sintéticos, cujas características antioxidantes são devidas a presença de grupamentos amino e/ou fenólicos (STUCKEY, 1962).

Mecanismo da ação antioxidante

A maioria das substâncias antioxidantes são compostos que possuem um átomo de hidrogênio ativo, cujo mecanismo poderia ser:

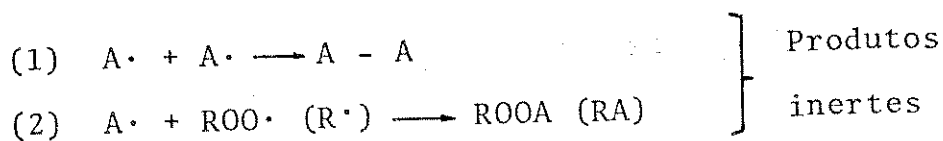


onde: AH = antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo.

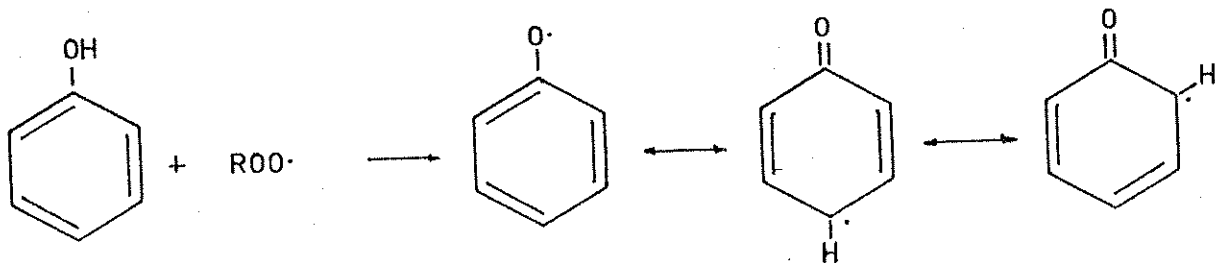
ROO· e R· = radicais livres

A· = radical inerte.

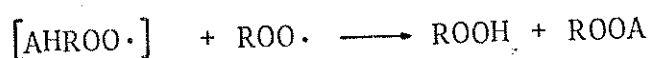
A ação antioxidante é devida a substituição de radicais livres ativos (ROO·, R·) por um radical inativo (A·). O novo radical A· é incapaz de continuar a reação em cadeia, e pode formar produtos estáveis por dimerização (1) ou reagir com um segundo radical livre (2) (FRANKEL, 1980).



No caso de compostos fenólicos, o radical fenoxi formado é um híbrido de ressonância estável (ALTWICKER, 1967; BUCK, 1981).

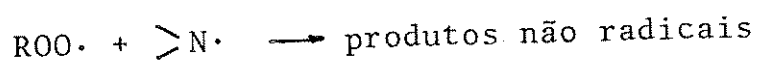


Para compostos fenólicos BOOZER, HAMMOND e colaboradores propuseram um outro mecanismo, no qual o átomo de hidrogênio não é removido da molécula do antioxidante, sendo a primeira etapa da inibição uma reação reversível de formação de um complexo com o radical livre ($\text{ROO}\cdot$, $\text{R}\cdot$). Este complexo é o que reage com um segundo radical livre.



Por este mecanismo não são formados os dímeros do antioxidante (A - A) (BOOZER & HAMMOND 1954; BOOZER *et alii*, 1955; HAMMOND *et alii*, 1955).

BROWNLIE & INGOLD (1966, 1967) propõem um mecanismo para a ação antioxidante de aminas ($>\text{N} - \text{H}$), similar ao mecanismo dos fenóis, como segue:



Porém, ADAMIC *et alii* (1970) explicam que o mecanismo de aminas é mais complicado que o dos fenóis pela frequente formação de radicais estáveis nitróxido ($>\text{NO}\cdot$) entre um radical livre ($\text{ROO}\cdot$) e o radical amino ($>\text{N}\cdot$) formando.



Antioxidantes que possuem múltiplos enlaces (Ex: quinonas) podem iniciar a autooxidação, associando radicais livres nestes múltiplos enlaces.

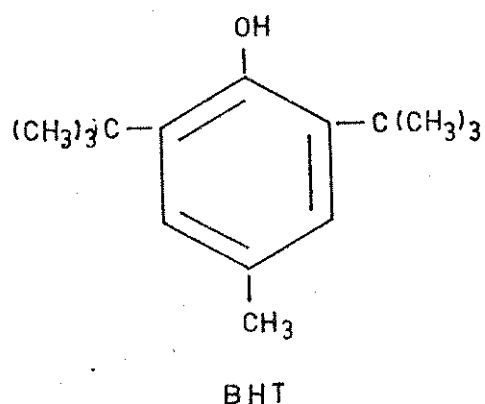
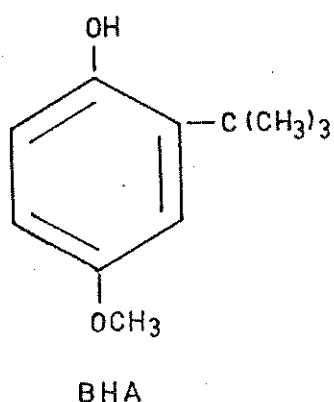


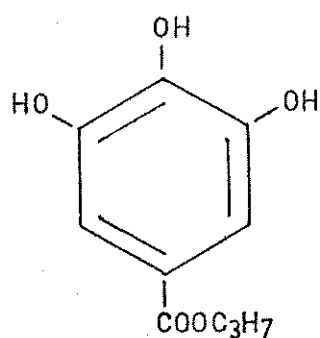
Esta reação dá origem a radicais ($ROOA\cdot$, $RA\cdot$) que não têm nenhuma atividade (REMBAUM & SZWARK, 1955).

Compostos fenólicos como antioxidantes

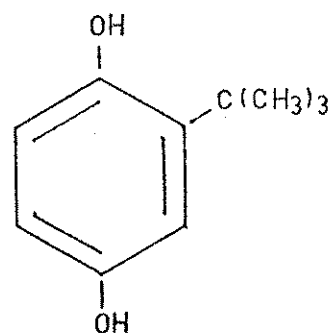
Extratos de muitas plantas têm mostrado vários graus de atividade antioxidante em óleos e gorduras ou alimentos que os contêm. Esta atividade é provavelmente devido a presença de substâncias fenólicas ou polifenólicas nos extratos (BRACCO *et alii*, 1981).

As substâncias fenólicas são sem dúvida nenhuma os compostos mais pesquisados e usados pelas suas propriedades antioxidantes em alimentos. Na atualidade os antioxidantes mais usados na indústria são 4 compostos fenólicos sintéticos: ter-butil-hidroxianisol (BHA), 2,6 di-ter-butil p-cresol (BHT), propil galato (PG) (SHERWIN, 1976) e ter-butil hidroquinona (TBHQ) (SHERWIN, 1978), usados individualmente ou em misturas para uma grande variedade de produtos alimentares (EASTMAN, 1974).





PG



TBHQ

No caso específico do BHT, ele é reconhecido como um potente antioxidante de baixa toxicidade e com boa solubilidade em óleo e insolúvel em água (SHERWIN, 1976).

A legislação brasileira (Brasil, 1977) permite que sejam usadas como antioxidantes várias substâncias fenólicas entre elas o BHT, BHA, PG, TBHQ, NDGA (ácido nor-di-hidroguaiarético) e tocoferóis, além de outras não fenólicas como ácido ascórbico, ácido fosfórico, citratos, fosfolipídios, ácido cítrico e resina de guaiaco.

Outras substâncias fenólicas antioxidantes, têm encontrado pouco ou nenhum uso em grande escala devido a problemas tecnológicos ou a restrições impostas pela legislação própria de cada país.

O maior conhecimento sobre o uso dos aditivos químicos em alimentos tem aumentado o interesse na substituição destes aditivos sintéticos pelos chamados aditivos naturais. (CHAN *et alii*, 1977).

As propriedades antioxidantes de ervas e especiarias como: canela, pimenta, cravo, pimenta do reino, gengibre, páprica, além de muitas outras, têm sido evidenciadas pela ação retardadora da rancidez (CHIPAULT (1957) *et alii* (1952, 1955, 1956); BRACCO *et alii*, 1981).

No caso de antioxidantes fenólicos naturais, duas famílias de compostos merecem especial atenção: tocoferóis e flavonóides.

Tocoferóis

Ao todo são conhecidos sete tipos de tocoferóis (α , β , ζ , γ , ξ , η , δ), que são formas metil substituídas do tocol (KRUKOVSKY & LOOSLY, 1952) amplamente distribuídas na natureza. A atividade vitamínica(E) é atribuída principalmente ao α -tocoferol (PARK HURST *et alii*, 1968).

Os tocoferóis são conhecidos como antioxidantes, e sua ordem de atividades em óleos vegetais é: $\delta > \gamma > \alpha$ (SHERWIN, 1976), porém, esta ordem de atividade pode ser influenciada pelas condições de luz e temperatura.

O α -tocoferol pode agir como pró-oxidante em altas concentrações (KOSKAS *et alii*, 1984; BAZIN *et alii*, 1984).

Flavonóides

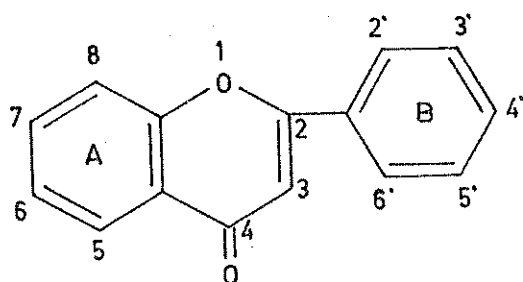
Os flavonóides são o maior grupo de substâncias fenólicas e estão amplamente distribuídos em plantas (HARBORNE *et alii*, 1975; HERMANN, 1976).

O termo flavonóide é usado para descrever um grupo de pigmentos fenólicos solúveis em água, algumas vezes conhecidos como antoxantinas. Flavans (leucoantocianinas) e catequinas assim como outras substâncias relacionadas também podem ser incluídas nesta categoria (HARBORNE, 1959).

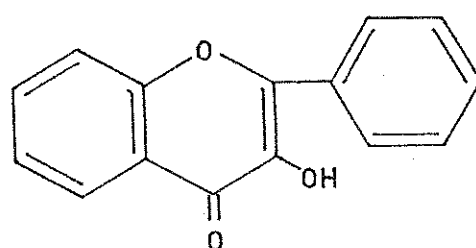
Estas substâncias podem ser extraídas da planta com etanol 70% permanecendo na fase aquosa após a extração com éter de petróleo (HARBORNE, 1973).

A característica deste grupo é o esqueleto de átomos de carbono ($C_6 - C_3 - C_6$) formado por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia alifática de 3 carbonos (HARBORNE *et alii*, 1975).

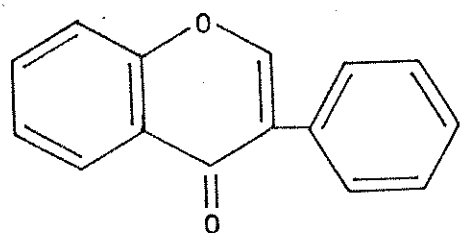
A variação no estado de oxidação da cadeia C_3 determina as propriedades e classe de cada composto. As classes mais importantes segundo MABRY *et alii* (1970) são:



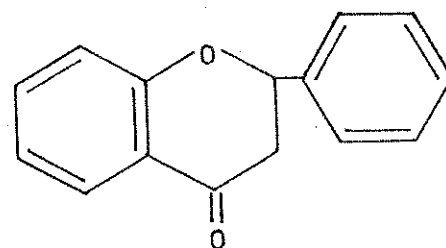
Flavonas



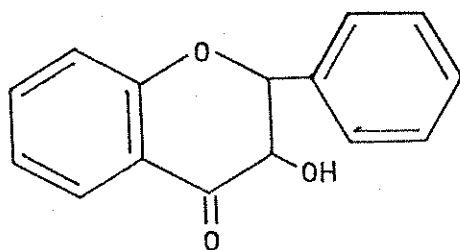
Flavanois



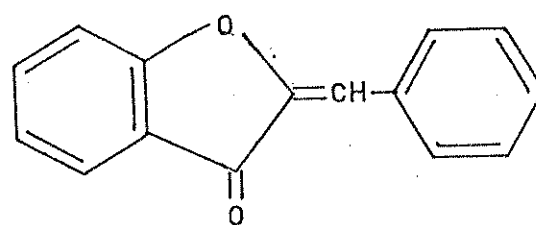
Isoflavonas



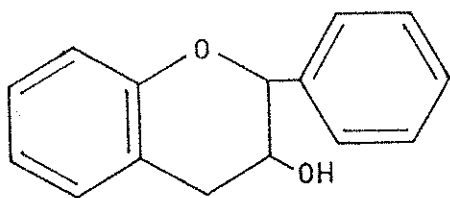
Flavanonas



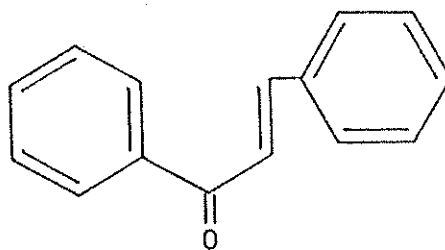
Dihidroflavonois



Auronas



Catequinas



Chalconas

Os flavonóides ocorrem na natureza principalmente como glicosídeos, os quais por hidrólise ácida com aquecimento produzem as frações aglicona e carbohidrato. Os açúcares mais comuns encontrados em combinação com flavonóides incluem galactose, arabinose, xilose e especialmente glicose e ramnose. Estes carboidratos podem estar ligados em qualquer grupamento hidroxila disponível. (BATE-SMITH, 1954).

Os grupamentos hidroxila são quase sempre encontrados nas posições 5 e 7 do anel A, enquanto que no anel B são comuns grupos hidroxila ou alcooxi (OR) nas posições 3' e/ou 4' (IKAN, 1969).

Os flavonóides estão presentes em todas as partes da planta e os métodos de isolamento dependem do material vegetal usado e do tipo de composto a ser isolado. Os solventes usados para a extração são escolhidos de acordo com a polaridade do flavonóide a ser estudado (MARKHAM, 1975).

Os solventes menos polares são usados para a extração de agliconas enquanto os mais polares para glicosídeos e antocianinas. As agliconas polares tais como isoflavonas, flavanonas e dihidroflavonois ou flavonas e flavonois metilados são extraídos geralmente com solventes como benzeno, clorofórmio, éter e acetato de etila (HENRICK & JEFFERIES, 1964; HARBORNE *et alii*, 1963; HERZ *et alii* 1972).

Uma pré-extração com hexano ou éter de petróleo é frequentemente feita para retirar esteróis, carotenóides, clorofilas, etc (BHUTANI, 1969; CLARK-LEWIS & PORTER, 1972).

Os glicosídeos e as agliconas mais polares tais como flavonas hidroxiladas, flavonois, auronas e chalconas são geralmente isoladas do material vegetal por extração com acetona, álcool, água ou por combinações destes (BOTTOMLEY *et alii*, 1966; DREYER & BERTELLI, 1967).

Devido a presença de carboidrato nos flavonóides glicosídeos os extratos de plantas são quase sempre hidrolizados antes de efetuar a análise (HARBORNE, 1973).

Referências detalhadas sobre distribuição, separação e identificação de flavonóides podem ser encontradas em HARBORNE (1959, 1967) *et alii* (1975); GEISMAN, 1962; MABRY *et alii*, 1970; DASS & WEAVER, 1972.

Além das propriedades antioxidantes já mencionadas, alguns flavonóides apresentam atividade farmaco-dinâmica, anti-espasmolítica, anti-inflamatória, anti-alérgica (HERRMANN, 1976) e anti-hemolítica (NAIM *et alii*, 1976). Estas substâncias com atividade biológica são referidas como bioflavonóides (HERRMANN, 1976).

Atividade antioxidante dos flavonóides

A atividade antioxidante de um grande número de flavonóides tem sido avaliada, tanto em sistemas lipídicos-aquosos (SIMPSON & URI, 1956; KELLEY & WATTS, 1957; PRATT & WATTS, 1964; PRATT, 1965, 1972; LETAN, 1966 a,b; HAMMERSCHMIDT & PRATT, 1978; PRATT & BIRAC, 1979; WHITTERN *et alii*, 1984; PRATT & MILLER, 1984) e não-

-aquosos (RICHARDSON *et alii*, 1947; KURT & CHAN, 1951; SIMPSON & URI, 1956; CRAWFORD *et alii*, 1961; HUDSON & MAHGOUB, 1980, 1981; HUDSON & LEWIS, 1983 a,b; DZIEDZIC & HUDSON, 1983 a,b).

A baixa solubilidade dos flavonóides em lipídios é considerada uma desvantagem se uma fase aquosa está presente, porém, estes compostos solubilizados na fase aquosa oferecem uma considerável proteção ao sistema; também tem sido observado que certos flavonóides têm atividade antioxidante, quando dispersos em óleos (PRATT & BIRAC, 1979).

Apesar do grande número de dados sobre a atividade antioxidante de flavonóides, deve-se ter cuidado na comparação dos resultados, já que os pesquisadores têm usado diversos métodos de avaliação, substratos e concentrações (DZIEDZIC & HUDSON, 1983 a). Isto comumente leva a resultados aparentemente contraditória sobre a potência de um composto.

Alguns flavonóides, como quercitina (3,5,7, 3',4'-penta-hidroxi flavona) e fisetina (3,7, 3',4'-tetra-hidroxi flavona), têm alta atividade em sistemas lipídicos-aquosos (PRATT & WATTS, 1964) e não-aquosos como óleo de soja puro (HUDSON & MAHGOUB, 1980) ou banha (HUDSON & LEWIS, 1983 b).

As isoflavonas daidzeína (4'-mono-hidroxi isoflavona) e genisteína (4',5-di-hidroxi isoflavona) mostram alta atividade num sistema aquoso de β -caroteno-ác. linoleico (PRATT & BIRAC, 1979) e pouca ou nenhuma em banha (DZIEDZIC & HUDSON, 1983 a). Esta mesma observação foi feita por IKEHATA *et alii* (1968) com a 6,7, 4'-tri-hidroxi isoflavona.

Além da atividade antioxidante de flavonóides, avaliada com o composto isolado, inúmeros extratos e frações de extratos que os contêm, também têm sido testados e em alguns casos com a

posterior separação do composto ou compostos ativos. Com esta finalidade foram analisados extratos de cebola, tomate, pimenta, aipo, obtidos com água quente, hidrolizados ou não (LEWIS & WATTS, 1958; PRATT & WATTS, 1964; PRATT, 1965), extratos metanólicos de sementes de algodão (WHITTERN *et alii*, 1984), soja (HAMMERSCHMIDT & PRATT, 1978; PRATT, 1972), amendoim (PRATT & MILLER, 1984).

PRATT & WATTS (1964) relatam que a hidrólise não afeta a atividade antioxidante dos extratos, igualmente observaram que a potência antioxidante de extratos das partes não comestíveis é maior que as comestíveis. Nenhuma atividade antioxidante foi encontrada pelos mesmos autores em um extrato de batata que não continha flavonóides.

Estrutura e atividade antioxidante de flavonóides

A correlação entre estrutura e atividade antioxidante não é clara devido, novamente, à diversidade de métodos e sistemas usados para a avaliação (HUDSON & LEWIS, 1983 a), porém, algumas indicações sobre esta correlação podem ser consideradas.

A atividade dos flavonóides é devida, aparentemente, à sua habilidade de atuar como inibidor de radicais livres e/ou como agente complexante de metais (HUDSON & LEWIS, 1983 a; CRAWFORD *et alii*, 1961; LETAN, 1966 a,b).

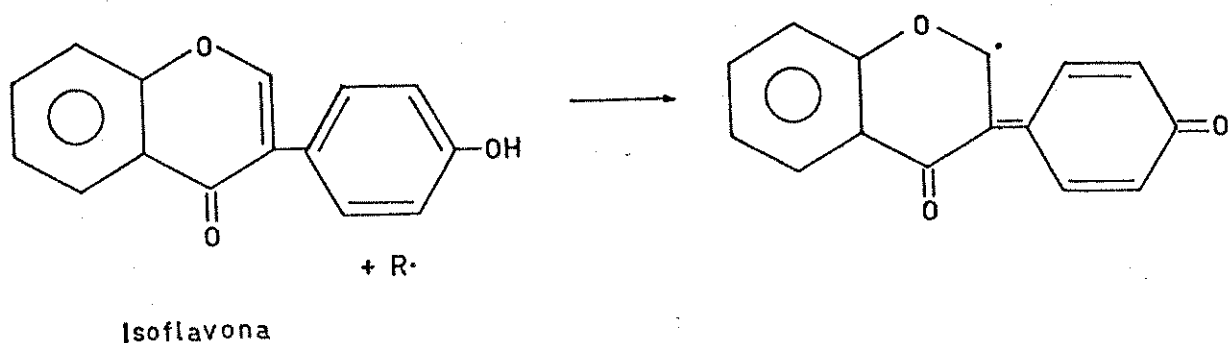
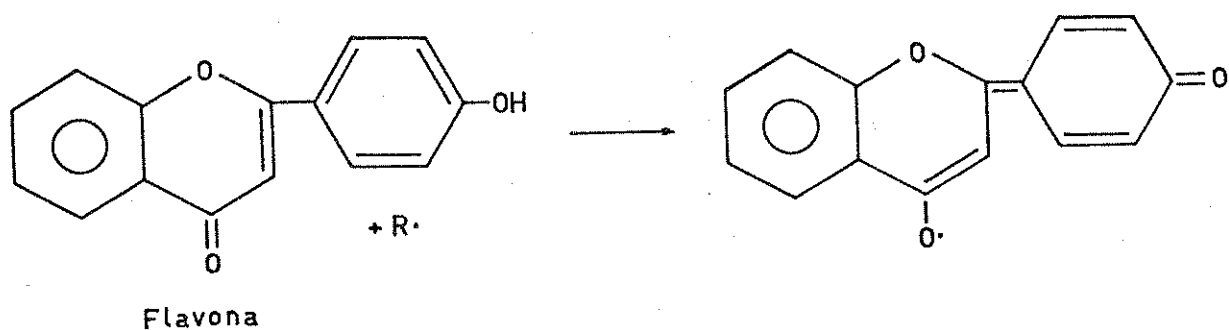
HEIMANN & KEIFF (1953), trabalhando com flavonas em linoleato de etila, encontraram que a presença de:

- 1) dupla ligação no C2 e o grupo cetônico no C4;
- 2) grupamento hidroxila (OH) no C3 e
- 3) grupos orto hidroxila no anel B, estão correlacionados com alta atividade antioxidante.

CRAWFORD *et alii* (1961) minimizaram a importância da dupla ligação (C2) e do grupo hidroxila (C3) quando do uso de banana como substrato. LEA (1962) concorda com a importância da dupla ligação (C2) e o 3-OH, já que a hidrogenação (C2) e metilação (3-OH) reduzem a atividade.

PRATT & WATTS (1964) em um sistema aquoso banana- β -caroteno, encontraram que a orto hidroxilação do anel B aumenta a capacidade antioxidante, enquanto a dupla ligação (C2), a meta hidroxilação no anel A (C5,7) e a glicosilação do 3-OH não alteram a atividade.

DZIEDZIC & HUDSON (1983 a) explicaram que na inibição dos radicais livres por flavonas ou isoflavonas é condição mínima a presença do grupamento hidroxila na posição 4' no anel B, já que só desta forma o radical livre pode ser estabilizado por ressonância.



As chalconas (3,4 hidroxí chalconas) são melhores antioxidantes que suas correspondentes flavanonas, porque podem formar arranjos mais espalhados dos radicais livres estabilizados por ressonância (DZIEDZIC & HUDSON, 1983 b).

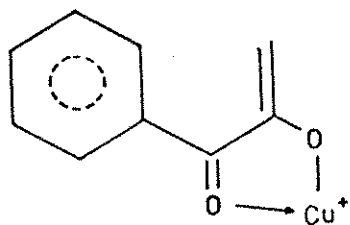
LETAN (1966 a) encontrou que a metilação das hidroxilas 3 ou 5, ou 3 e 7, ou 5 e 7, reduz a atividade da quercitina em esteres metílicos de ácidos graxos, igualmente acontecendo com a metilação das hidroxilas 3' e/ou 4' do anel B, mas em maior grau.

Com respeito a atividade quelante dos flavonóides, LETAN (1966 b) reporta que a substituição das hidroxilas 3-OH e/ou 5-OH a diminuem, e que os grupamentos orto hidroxila do anel B têm pouca atividade, isto em estudos de oxidação de um sistema aquoso de ác. ascórbico contendo íons cobre (Cu^{++}).

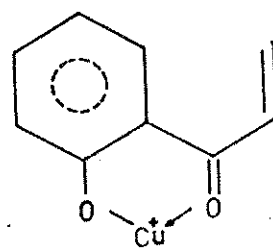
DETTY *et alii* (1955) explica que a atividade quelante de flavonas depende do pH, e que são possíveis 3 sistemas de quelação intermolecular:

- 1) entre a hidroxila C5 e o grupo cetônico (C4)
- 2) entre a hidroxila C3 e o grupo cetônico (C4)
- 3) entre grupos orto hidroxila.

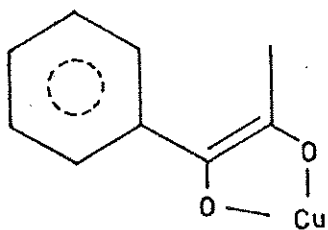
HUDSON & LEWIS (1983 a) reportam que as flavonas e flavanonas podem formar complexos com cobre como segue:



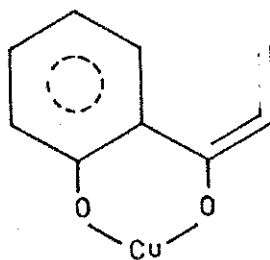
3-hidroxí flavonas



5-hidroxí flavonas



3-hidroxi flavanonas



5-hidroxi flavanonas

Dos dados encontrados na literatura anteriormente mencionada, pode-se concluir que são importantes para a atividade antioxidante de um flavonóide a presença de:

- 1) grupo cetônico (4-CO)
- 2) grupos hidroxila múltiplos, especialmente os 3'-OH e 4'-OH (orto)
- 3) grupo 3-OH e/ou 5-OH.

Taninos

Estas substâncias fenólicas de peso molecular entre 500 e 3000, são relacionadas frequentemente junto aos flavonóides e também possuem atividade antioxidante (SPAMMUTH, 1946; BERK, 1976).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para tornar a exposição do trabalho mais coerente, foi estabelecido o seguinte roteiro para o desenvolvimento da pesquisa o qual consta de 5 etapas básicas, cada uma com seu objetivo específico:

- 1a. Etapa: Seleção dos extratos com maior atividade an tioxidante em um sistema modelo aquoso.
- 2a. Etapa: Confirmação da atividade antioxidante dos extratos selecionados num sistema lipídico.
- 3a. Etapa: Isolamento e Purificação de compostos presentes nos extratos que apresentaram maior atividade antioxidante nos dois sistemas ci tados.
- 4a. Etapa: Identificação dos compostos isolados e puri ficados.
- 5a. Etapa: Determinação da atividade antioxidante dos compostos isolados.

Com o objetivo de fazer mais claras as informações referentes a este capítulo, os materiais usados estão incluídos na descrição de cada método.

Obtenção dos extratos

Os extratos das plantas usadas neste trabalho aparecem na Tabela 1 e foram fornecidos pelo Centro de Pesquisas da Rhodia S.A.; sendo preparados segundo o esquema estabelecido na Figura 1.

Seleção (1a. Etapa)

A capacidade antioxidante de 140 extratos, correspondentes a 45 plantas (Tabela 1), foi testada em um sistema modelo de β -caroteno-ácido linoleico (Fluka 22040; Virtu's Ind. e Com. Ltda., SP.), segundo o método descrito por HAMMERSCHMIDT & PRATT (1978), modificado como se descreve a seguir:

- . 0,5 mL de uma solução de β -caroteno em clorofórmio (0,2 mg/mL) são colocados num balão soxhlet de 100 mL, contendo 20 mg de ácido linoleico e 200 mg de tween 40 (monopalmitato de sorbitan etoxilado, Atlas Indústrias Químicas).
- . O clorofórmio é removido por evaporação, usando uma bomba de vácuo (Ind. Mec. Primar Mod. 151).
- . Adiciona-se a seguir, 2 mg do extrato liofilizado e 50 mL de água destilada, para formar uma emulsão, pela agitação por 30 segundos num homogenizador Ultraturrax (Janke & Kunkel, Ika Werk).
- . Uma alíquota (10 mL aprox.) é colocada numa cubeta (19 x 105 mm Coleman nº 6-326) e mantida a 50°C em banho-maria (Grant Mod. 55-40), com agitação (100 osc./min).

TABELA 1 Nome científico, família e nome comum das plantas estudadas.

Nome científico	Família ^a	Nome comum ^b
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Leguminosae; Mimosoideae	Barbatimão
<i>Piptadenia macrocarpa</i>	"	Angico do campo
<i>Pterodon pubescens</i>	" ; Faboideae	Faveiro
<i>Centrolobium tomentosum</i>	"	Araribã
<i>Indigofera truxillensis</i>	"	Anileira
<i>Hymenaea courbaril</i>	"	Jutaí-açu
<i>Cassia chrysocarpa</i>	"	Fedegoso
<i>Vanillosmopsis erythropappa</i>	Compositae	Cambará, candeia
<i>Piptocarpha macropoda</i>	"	Cambará preto
<i>Mikania smilacina</i>	"	Condurango
<i>Vernonia diffusa</i>	"	Casca-preta
<i>Ambrosia artemisiaefolia</i>	"	Ambrosia americana
<i>Senecio icoglossus</i>	"	
<i>Baccharis trimera</i>	"	Carqueja amargosa
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	"	Vassoura

TABELA 1 Nome científico, família ... (continuação).

Nome Científico	Família ^a	Nome comum ^b
<i>Byrsonima variabilis</i>	Malpighiaceae	Cipó-prata
<i>Banisteria argyrophylla</i>	"	Guaçatunga
<i>Casearia sylvestris</i>	Flacourtiaceae	Tamanqueira
<i>Fogara rhoifolia</i>	Rutaceae	Butuá do corvo
<i>Cochlospermum insigne</i>	Cochlospermaceae	
<i>Aspidosperma nemorale</i>	Apocynaceae	Levreiro
<i>Peschiera montana</i>	"	
<i>Coleus barbatus</i>	Labiatae	Imbauba vermelha
<i>Cecropia peltata</i>	Moreaceae	Jupicanga
<i>Solanum variabile</i>	Solanaceae	Joá
<i>Solanum viarum</i>	"	
<i>Datura suaveolens</i>	"	Trombeteira
<i>Datura candida</i>	"	Metel
<i>Datura metel</i>	"	
<i>Datura caribolensis</i>	"	

TABELA 1 Nome científico, família ... (continuação).

Nome científico	Família ^a	Nome comum ^b
<i>Aloe vera</i>	Liliaceae	Babosa
<i>Equisetum martii</i>	Equisetaceae	Canna de jacaré
<i>Psychotria pallens</i>	Rubiaceae	Erva do rato
<i>Peptiveria tetrandia</i>	Phytolaccaceae	Tipi
<i>Gallesia garorema</i>	"	Guararema
<i>Tillandsia usneoides</i>	Bromeliaceae	Barba do velho
<i>Luehea grandiflora</i>	Tiliaceae	Açoita cavalo
<i>Triumfetta bartramia</i>	"	Carrapicho da calçada
<i>Cupania sp.</i>	Sapidaceae	
<i>Mirabilis jalapa</i>	Nyctaginaceae	Bonina
<i>Argemone mexicana</i>	Papaveraceae	Cardo santo
<i>Lithraea molleoides</i>	Anacardiaceae	Aroeira-branca
<i>Callophyllum brasiliensis</i>	Guttiferae	Guanandí
<i>Sapium biglandulosum</i>	Euphorbiaceae	
<i>Johannseia princeps</i>	"	Anda-assú

a) JOLY, 1979. b) CORREA, 1926, ALZUGARAY & ALZUGARAY 1983.

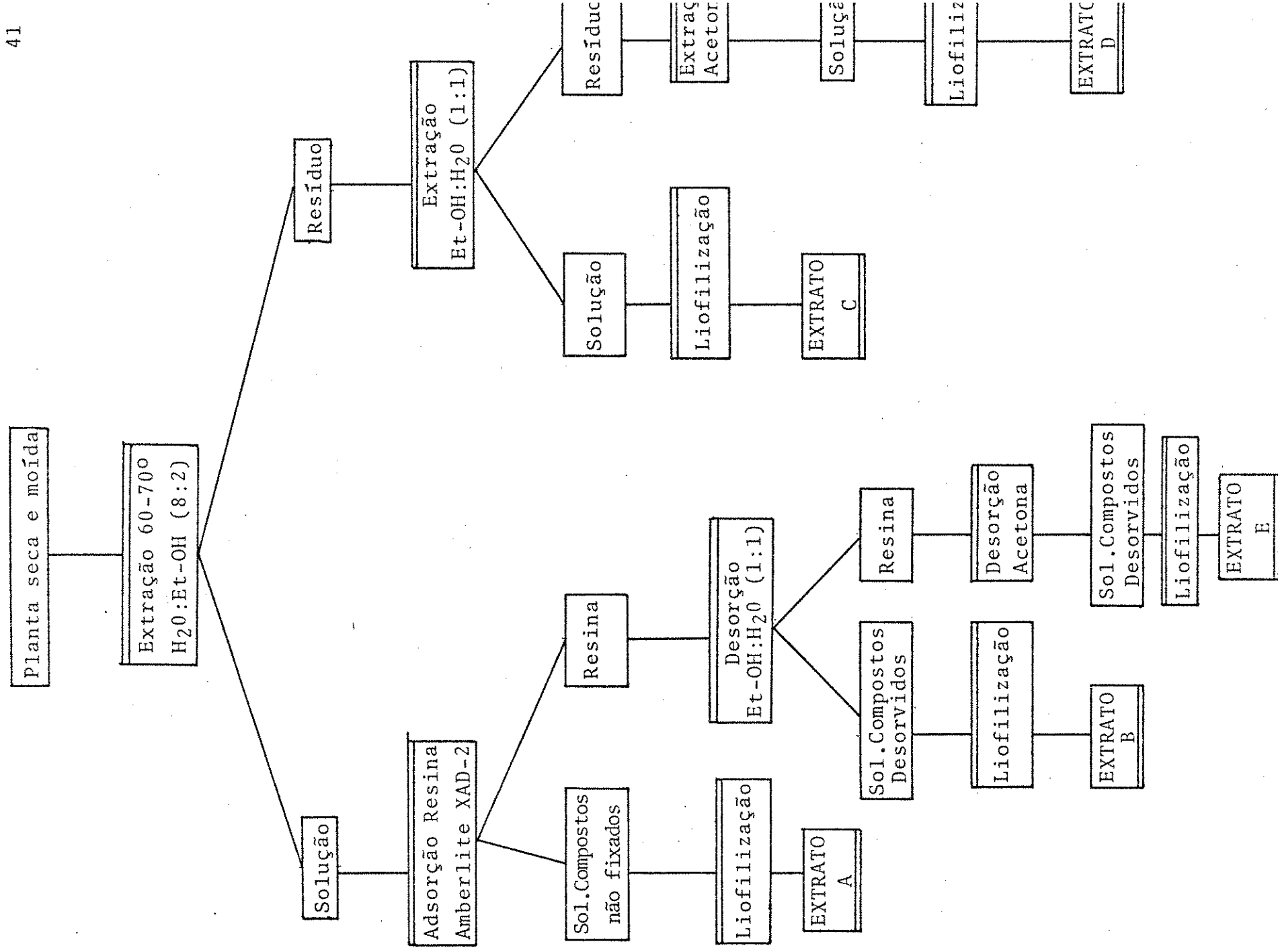


FIGURA 1 - Esquema de trabalho utilizado pela Rhodia S.A. na obtenção dos extratos.

. As leituras foram tomadas a cada 15 min num espectrofotômetro (Coleman 295 E) a 470 nm, por um tempo de 105 min (1h 45 min).

. Simultaneamente com a emulsão contendo o extrato, são também corridos um branco (transmitância = 100), contendo todos os reagentes menos β -caroteno e um padrão (testemunha) contendo todos os reagentes menos o extrato da planta.

Critério de seleção

A oxidação do sistema β -caroteno-ácido linoleico se revela no desaparecimento da cor amarela da emulsão, o qual ocasiona um aumento na transmitância da mesma. Portanto, a adição de substâncias ao sistema que possuam propriedades antioxidantes fará com que este aumento seja mínimo no decorrer do teste.

Experiências com substâncias com conhecido poder antioxidante (ver Tabela 4 Resultados) mostraram que nas condições do teste, um incremento na transmitância ($\Delta\%T$) de valores menores que 5% seria um bom indicador da capacidade antioxidante. Este critério de aumentos menores de 5% foi usado para a escolha dos extratos a serem analisados na etapa seguinte.

Confirmação (2a. Etapa)

A capacidade antioxidante dos extratos selecionados na primeira etapa (42 extratos) foi testada agora, num sistema lipídico (óleo refinado de soja, Marca Nosso fornecido pela Crovel S.A.) da seguinte maneira:

- . Num tubo de reação do Rancimat 617 (Methrom) foram colocados: 50 mg do extrato dissolvidos em 2 mL de água destilada, adicionando 200 mg de tween 40 e 5 g de óleo de soja.
- . No caso de extratos solúveis em solução alcoólica, a água foi substituída por 4 mL de álcool etílico a 50% v/v.
- . O tubo foi mantido no aparelho Rancimat por 3 hs a 110°C com um fluxo de ar de 20 L/min.
- . Após este período, o óleo foi transferido e pesado num erlenmeyer de 125 mL e determinado seu índice de peróxido (IP) segundo o método oficial Cd 8-53 da AOCS (1973).
- . Em cada corrida (4 extratos), foi feita também a determinação de um branco (óleo puro) e de 5 mg de BHT (2-6-di-terbutil p-cresol, Fluka 34750), para comparação do desempenho antioxidante dos extratos.

Critério de escolha na confirmação

O BHT é reconhecido como um bom antioxidante e usado amplamente na indústria de óleos comestíveis (SHERWIN, 1976). Assim, o desempenho dos extratos como antioxidantes foi comparado com o desta substância. Para isto foi estabelecido o parâmetro " ΔIP " que é a diferença entre o IP de 5 mg de BHT e o IP de 50 mg do extrato, onde valores positivos indicam maior poder antioxidante do extrato que o BHT e negativos menor potência. A quantidade de extrato usada (50 mg) foi definida com base na hipótese de que o componente antioxidante mais ativo encontra-se numa proporção máxima de 10% no extrato (5 mg). Desta forma os dados obtidos nesta etapa podem ser comparados com o BHT (5 mg).

Isolamento e Purificação (3a. Etapa)

Nesta 3a. Etapa poder-se-ia trabalhar com 9 extratos correspondentes a 7 plantas que mostraram alta atividade antioxidante nos dois sistemas porém a exceção da cromatografia em camada delgada ("screening"), que foi feita com 8 extratos, a análise foi concentrada sobre os extratos de: *Cochlospermum insignne* (C, raiz); *Solanum viarum* (A, folhas e galhos); *Piptadenia macrocarpa* (B, folhas) e *Mikania smilacina* (A, folhas). Isto porque o tempo e recursos necessários à análise dos 9 extratos seriam muito grandes, além de que os 4 extratos referidos apresentaram maiores facilidades na análise com os métodos usados neste trabalho.

A separação destes extratos foi tentada a partir do extrato ou seus derivados: hidrolizado, metilado ou acetilado, preparados de acordo com as Figuras 2, 3 e 4.

As técnicas empregadas nesta etapa são descritas a seguir:

Cromatografia em camada delgada (CCD)

Esta técnica foi usada para um "screening" rápido das características cromatográficas dos extratos originais e seus derivados em vários sistemas de solventes, assim como na monitoragem para testar a pureza dos compostos isolados com outras técnicas cromatográficas. Flavonóides puros como padrões (ver Tabela 4 resultados) foram cromatografadas junto aos extratos ou suas frações.

Foram usadas placas de vidro (20 x 20; 10 x 20 cm) impregnadas com sílica gel (Kieselgel 60 GF₂₅₄; Merck, 11678) de

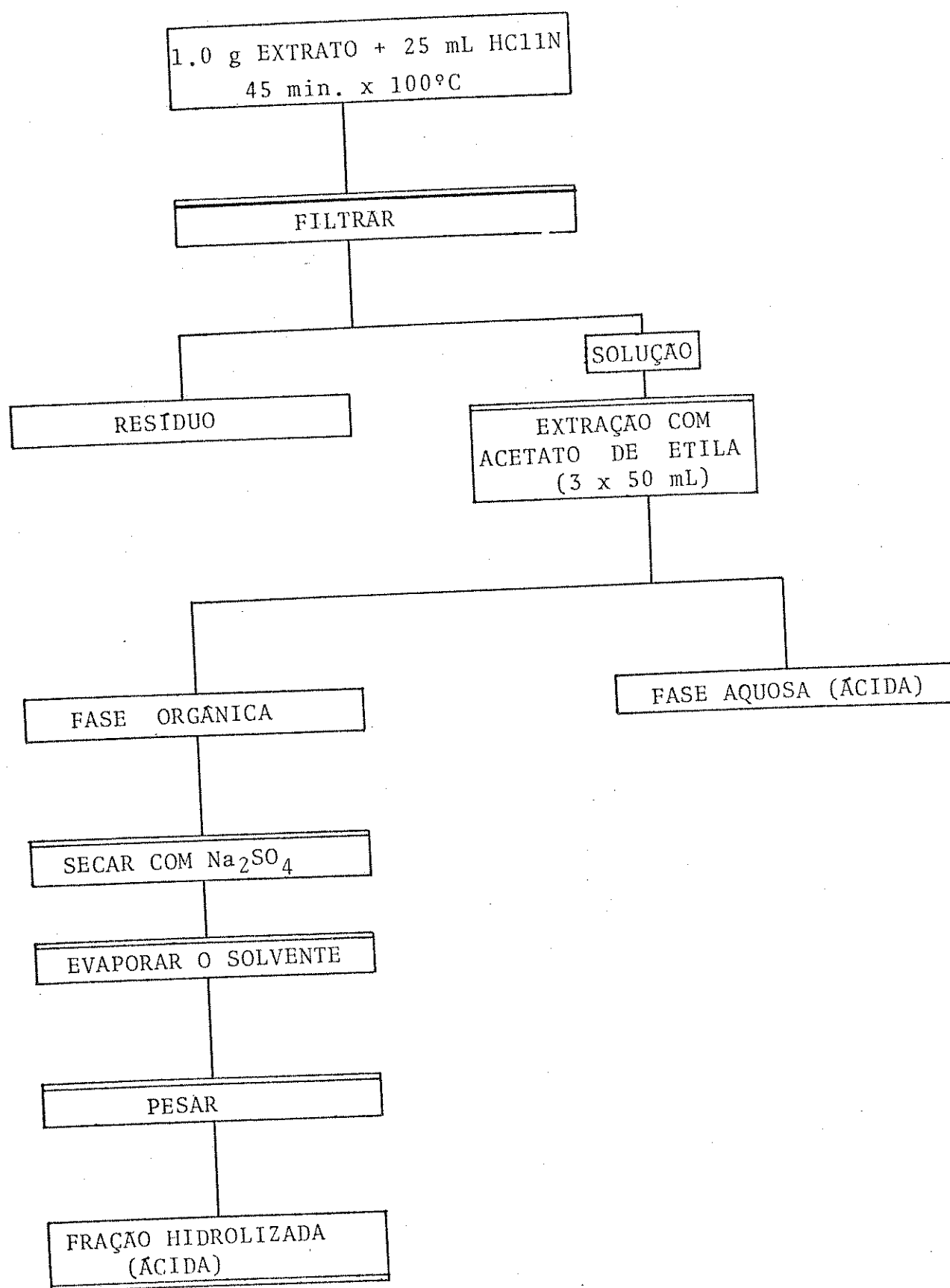


FIGURA 2 - Diagrama da hidrólise dos extratos
(HUDSON & MAHGOUD, 1980).

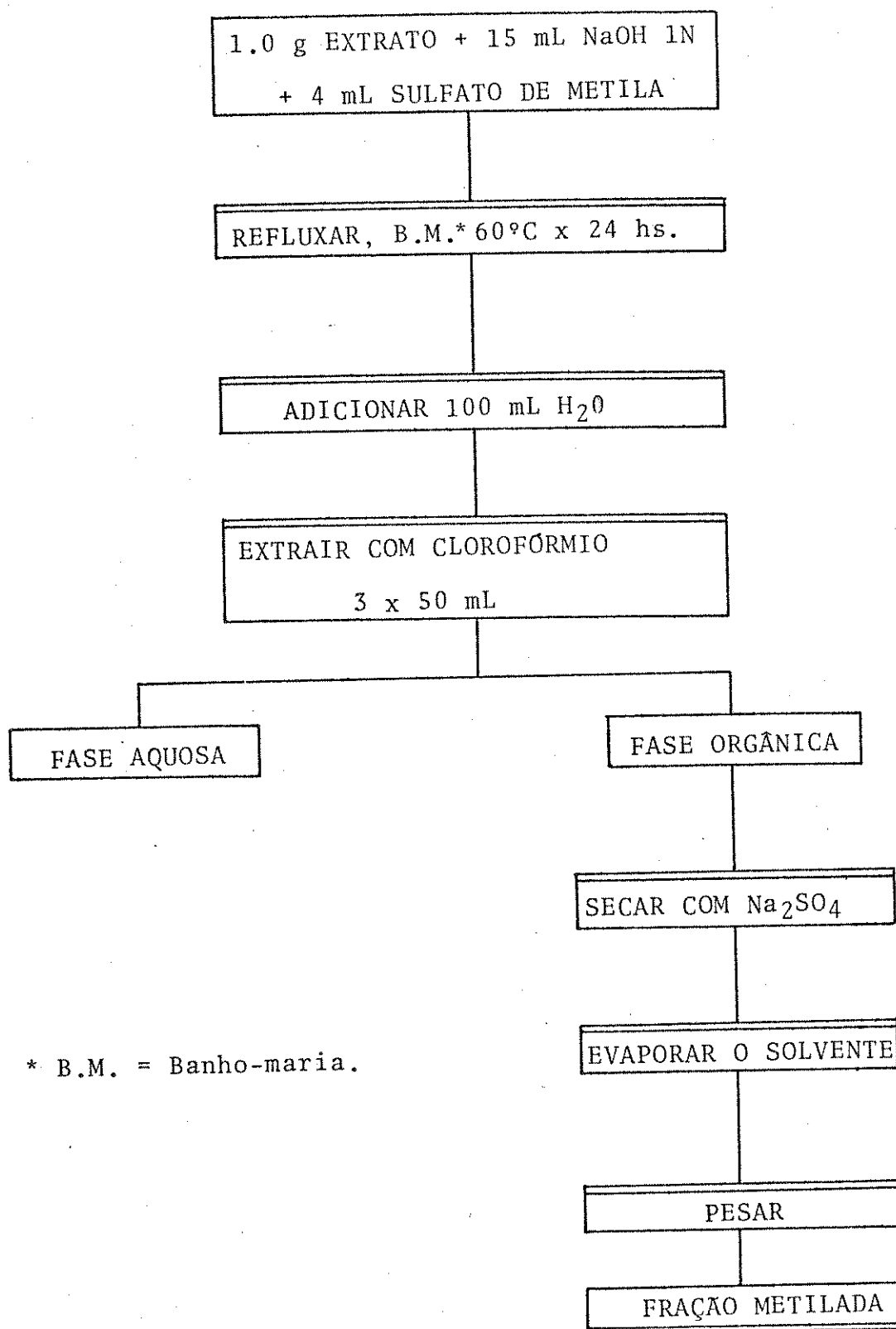


FIGURA 3 - Diagrama da metilação dos extratos.

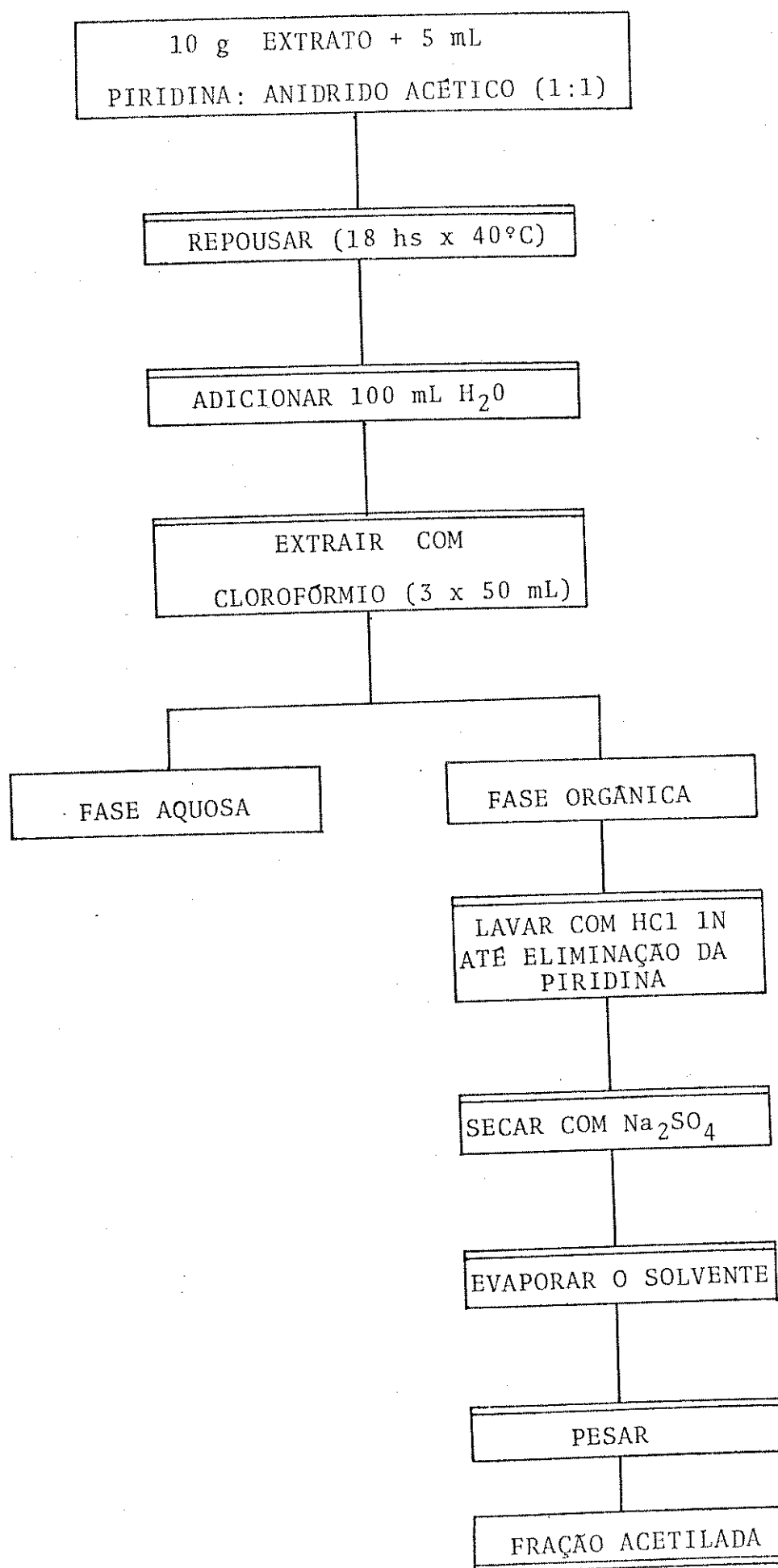


FIGURA 4 - Diagrama da acetilação dos extratos.

0,25 mm de espessura, preparadas no laboratório com equipamento De_saga e ativadas a 100°C por 30 min..

Além do uso de placas de sílica, em alguns casos foram utilizadas placas de celulose (DC-Alufolien F₂₅₄) de 20 x 20 cm com 0,1 mm de espessura e placas de poliamida 6 DF₂₅₄ (Riedel & Hßen) de 10 x 20 cm com 0,25 de espessura preparadas segundo a técnica descrita por RANDERATH (1963).

A revelação foi feita de acordo com a necessidade de cada teste com:

- a) Luz Ultravioleta 254 nm e 366 nm numa cabine Hanau-Fluotest.
- b) Solução H₂SO₄/MeOH (1:1), com aquecimento a 100°C x 10 min.
- c) Solução de DPPH (Difenil picril hidrazil; Fluka 43180) em butanol (GLAVIND & HOLMER, 1967) para testar provável atividade antioxidante das frações.
- d) Solução de β-caroteno em clorofórmio (PHILIP, 1974).
- e) Solução de cloreto férrico (FeCl₃) (STAHL, 1969) Revelador nº 102.

Cromatografia em Camada Delgada preparativa (CCD-prep)

Foram usadas placas de 20 x 20 cm com 1 mm de espessura impregnadas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck, 7747) preparadas no laboratório, utilizando como eluente diversos sistemas de solvente e eluídas 2 ou 3 vezes segundo a necessidade.

Cromatografia em Papel (CP)

Usou-se o procedimento descrito por MABRY *et alii* (1970) especial para flavonóides, com papel Whatman nº 1.

Cromatografia em Coluna (CC)

Foram usadas colunas de vidro (4,1 x 20; 2,4 x 20; 1,4 x 20 cm) com válvula de teflon empacotadas com as seguintes fases estacionárias:

Sílica gel (Kieselgel 60; Merck 7734);

Celulose microcristalina (Avicel PH 101; Fluka 11365);

Poliamida 6D (Riedel & Hænen 33590);

Amberlite XAD-2 (Fluka 06433);

Sephadex LH-20 lipofílico 25-100 µm (Sigma).

Quando usou-se sílica gel, o empacotamento, a aplicação da amostra, as quantidades de amostra e adsorvente, o volume das frações foram feitos segundo o método de TABER (1982), sendo a escolha do sistema de solventes de acordo com as características cromatográficas da amostra, obtendo-se geralmente 30 frações, 5 de cada sistema de solventes.

As colunas de poliamida foram eluídas usando o gradiente de solventes descrito por MARKHAM & MABRY (1968).

Para separações com colunas de poliamida e sephadex LH-20 sucessivas ou para sephadex LH-20 isolada, foi usado o método de THOMPSON *et alii* (1972).

As colunas de celulose foram eluídas com acetato de etila: metanol nas seguintes proporções (100:0; 98:2; 95:5; 90:10; 75:25; 50:50).

A cromatografia com amberlite XAD-2 foi empregada em fase reversa usando como eluente água e soluções de acetonitrila (1, 2, 5, 10, 20 e 50% de acetonitrila) ou em fase normal com soluções aquosas de etanol (100, 90, 80, 70, 50, 30, 10% de etanol), obtendo-se 5 frações de cada sistema de solventes em ambos casos.

Em experiências em que frações pequenas (10 mL) e numerosas (>30) foram coletadas usou-se um Coletor de frações linear (Büchler LC-200).

As frações obtidas por este método (CC) foram concentradas num evaporador rotativo (Büchi R110) e monitoradas por CCD. As frações que continham água como solvente (colunas de poliamida e amberlite XAD-2) foram liofilizadas (Liofilizador VIRTIS MOD 10-146 MRE) e posteriormente monitoradas por CCD.

Cromatografia líquida de alta eficiência - preparativa (CLAE-prep)

O equipamento usado foi um sistema Waters Prep-LC/500, com cartuchos de sílica gel Pre-pak 500 (5,7 x 30 cm), com pressão de 7 kgf e detetor de índice de refração.

Cromatografia gasosa (CG)

O equipamento foi utilizado nas seguintes condições:

Cromatógrafo: HP-5985B (sistema acoplado CG-EM).

Coluna: SE-30, 5%, 1,0 m.

Gás de arrastre: hélio.

Fluxo de gás: 40 mL/min.

Temperatura do injetor: 250°C.

Temperatura inicial da coluna: 100°C.

Programação de temperatura: 5°C/min. até 200°C.

Identificação (4a. Etapa)

Para a obtenção de dados que permitissem a identificação dos compostos presentes nos extratos foram usadas as seguintes técnicas e equipamentos:

Espectroscopia no Ultravioleta (UV)

O procedimento descrito por MABRY *et alii* (1970) para flavonóides, foi usado para a determinação dos espectros de absorção ultravioleta, procedimento esse que inclui 6 espectros, sendo um em metanol e 5 obtidos pela adição de reagentes à solução metanólica (NaOMe; AlCl_3 ; AlCl_3/HCl ; NaOAc; NaOAc/ H_3BO_3).

Os espectros foram obtidos num espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-3 com registrador Perkin-Elmer modelo 561, usando cubetas de quartzo de 1 cm. (Perkin-Elmer 079392).

Espectroscopia no infravermelho (IR)

Os espectros infravermelhos dos compostos em pastilha de KBr, foram feitos usando um espectrofotômetro infravermelho Perkin-Elmer 267.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN'H)

Os espectros RMN'H foram obtidos dos compostos dissolvidos diretamente em deutero-metanol ou do seu derivado trimetilsilil-eter (TMS-eter) em tetracloreto de carbono (CCl_4), preparados segundo MABRY *et alii* (1965) e com padrão interno de tetrametilsilano.

O aparelho usado foi um Espectrômetro de Ressonância magnética Varian XL-100.

Espectrometria de Massa (EM)

Usou-se um espectrômetro de massa HP-5985B, nas seguintes condições:

Faixa de massa: 10 - 600 uma

A/p : 3

Threshold : 5

Temperatura da fonte: 200°C

Voltagem do detetor: 2200v

Energia eletrônica: 70 ev

Os espectros de massa foram obtidos pela introdução direta da amostra ou pelo acoplamento de espectrômetro a um cromatógrafo de gás (vide CG).

Ponto de fusão (PF)

Os pontos de fusão foram determinados usando um aparelho Fisher-Johns (+ 300°C).

Rotação Óptica

A rotação óptica $[\alpha]_D^{20}$ do composto dissolvido em metanol, foi determinado num polarímetro Karl Zeiss (373147), usando uma célula de 1 dm.

Teste de Fenóis

Para detectar a presença de compostos fenólicos foi usado o método qualitativo com tricloreto de ferro (FeCl_3) e ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), segundo PRICE & BUTLER (1977).

Determinação do conteúdo de taninos

Para medição do teor de taninos nos extratos com maior atividade antioxidante, foi usado o ensaio com vanilina, segundo PRICE *et alii* (1978).

Determinação da atividade antioxidante
dos compostos isolados (5a. Etapa)

A atividade antioxidante dos compostos ou frações isoladas dos extratos, foi testada num sistema lipídico (óleo de soja), como descrito anteriormente na etapa de confirmação (2a. etapa), adicionando 5 mg a 5 g de óleo e comparando os resultados com 5 mg de BHT (0,1%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção (1a. Etapa)

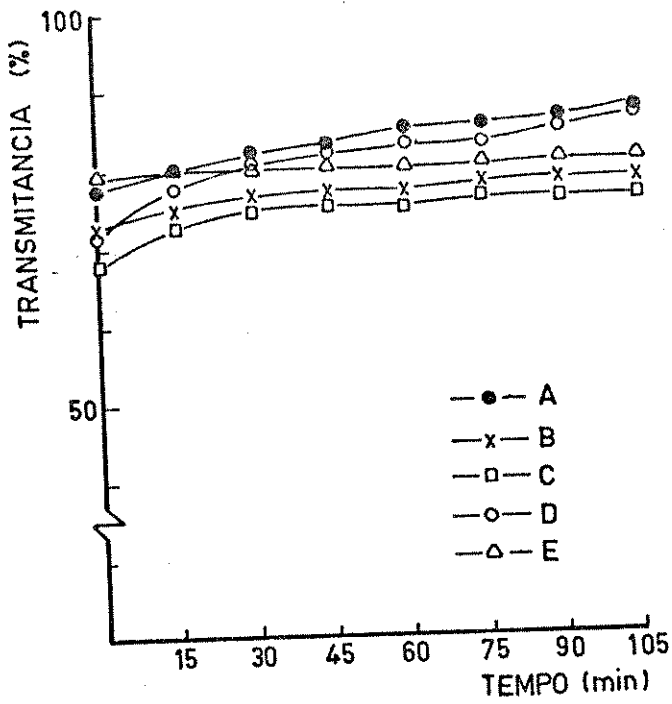
Na série de gráficos correspondentes à Figura 5 mostra-se o desempenho dos 140 extratos testados no sistema aquoso de β -caroteno-ácido linoleico, em cada gráfico estão representados os extratos correspondentes à uma planta ou parte da planta usada na elaboração dos mesmos (vide Figura 1).

Como a oxidação do sistema β -caroteno-ácido linoleico ocasiona um aumento na transmitância da emulsão, o extrato terá um comportamento antioxidante se no decorrer do teste as mudanças nos valores de transmitância forem mínimas ou nulas.

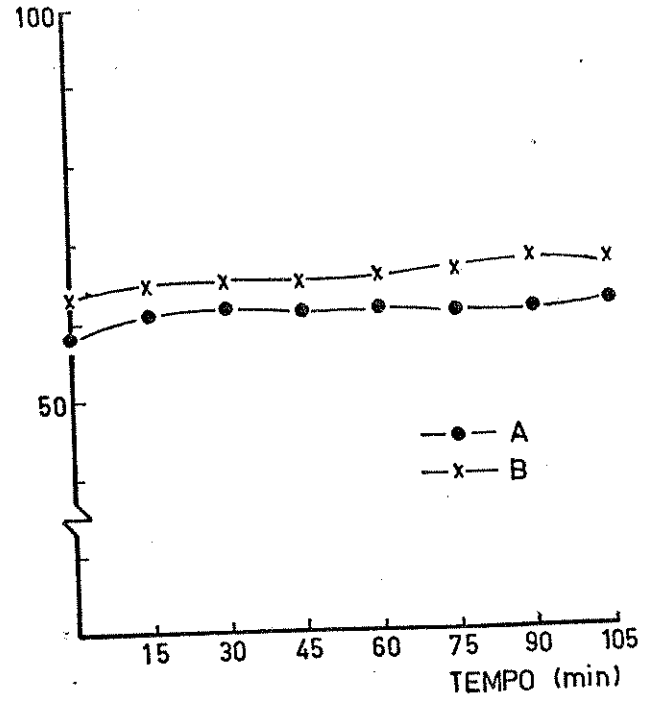
A atividade antioxidante do extrato neste sistema está representada pela inclinação da curva, sendo que quanto menor for a inclinação, maior será a potência antioxidante do extrato.

Em geral, nos extratos com pouca atividade antioxidante observa-se que o valor da transmitância aumenta rapidamente no início do teste seguido de uma estabilização ou diminuição da taxa de aumento no final da avaliação. (Ex: extratos A gráficos 3, 4, 7). Este comportamento indica que provavelmente no começo do teste houve uma oxidação rápida com um grande consumo de oxigênio e na etapa final a estabilização se deve, não a que o extrato esteja protegendo o sistema, mas sim a que a concentração do oxigênio é mais baixa e a taxa de oxidação se reduz.

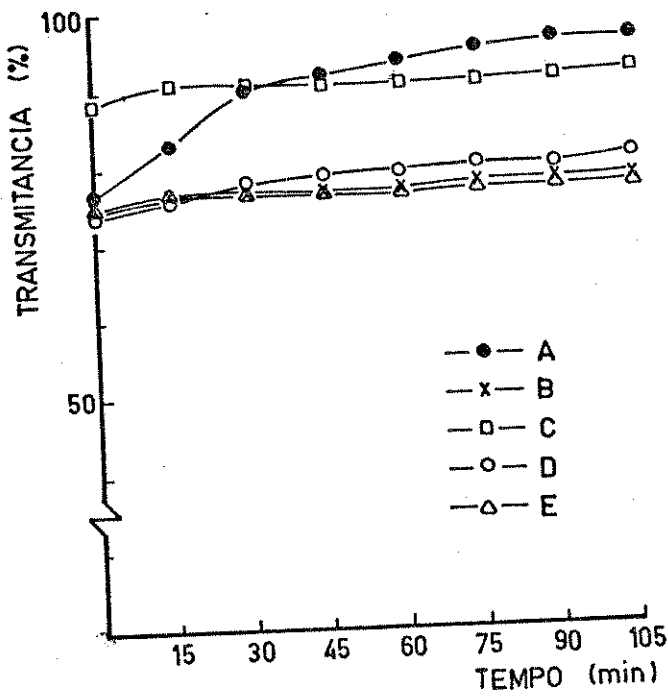
Alguns extratos apresentaram incrementos constantes ao longo do teste, porém menores que no caso anterior, indicam tam-



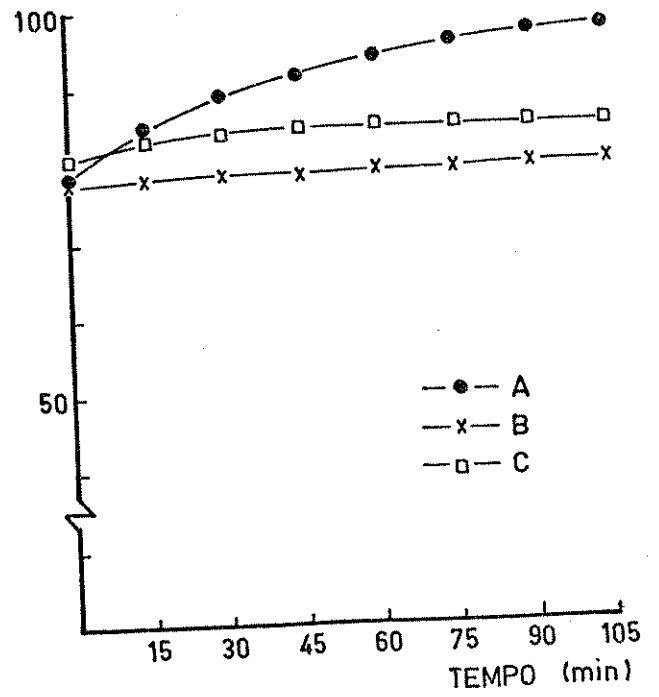
(1) *Stryphnodendron barbatiman* (Folhas)



(2) *Stryphnodendron barbatiman* (Casca)

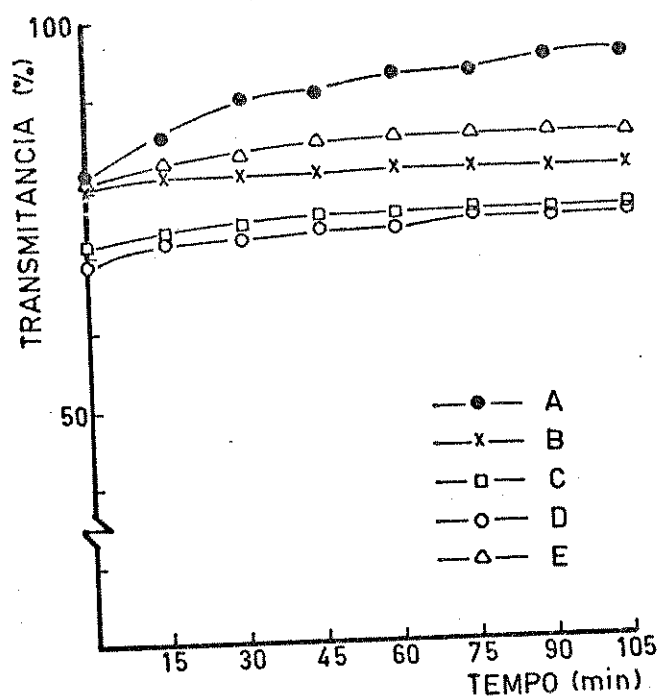


(3) *Piptadenia macrocarpa* (Casca)

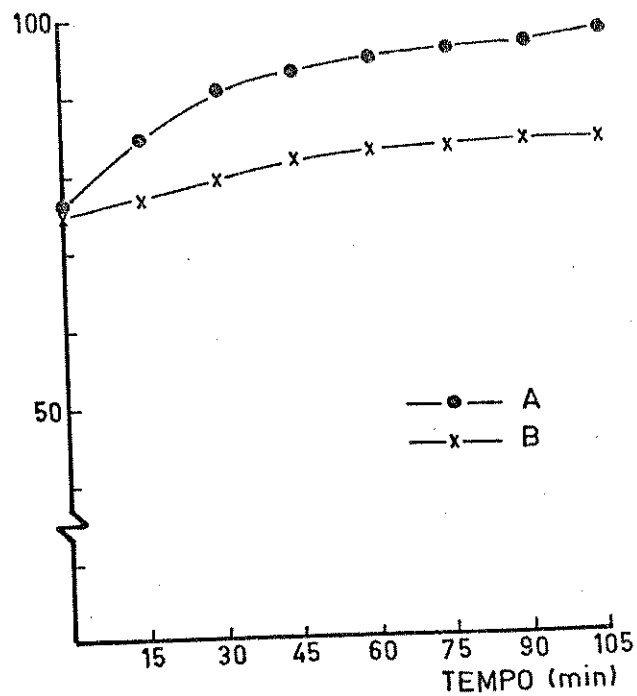


(4) *Piptadenia macrocarpa* (Raiz)

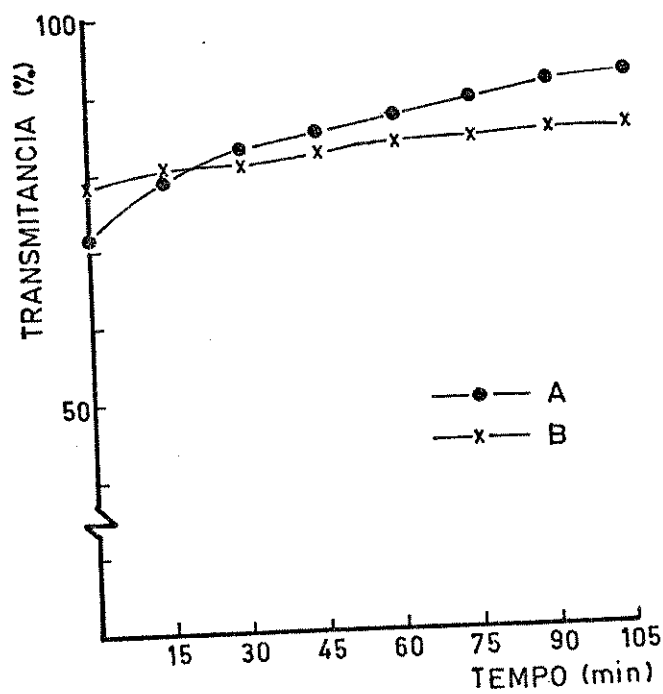
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante dos extratos no sistema modelo β -caroteno-ácido linoleico. 105 min. x 50°C.



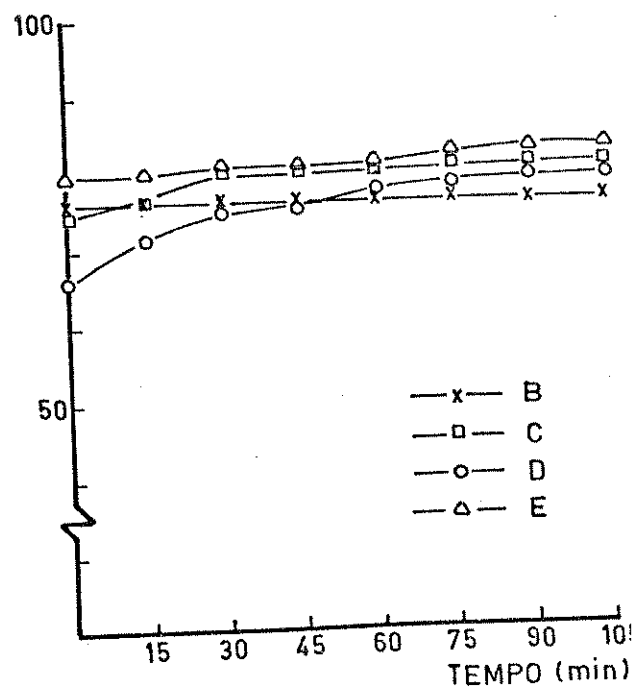
(5) *Piptadenia macrocarpa* (Folhas)



(6) *Pterodon pubescens* (Raiz)

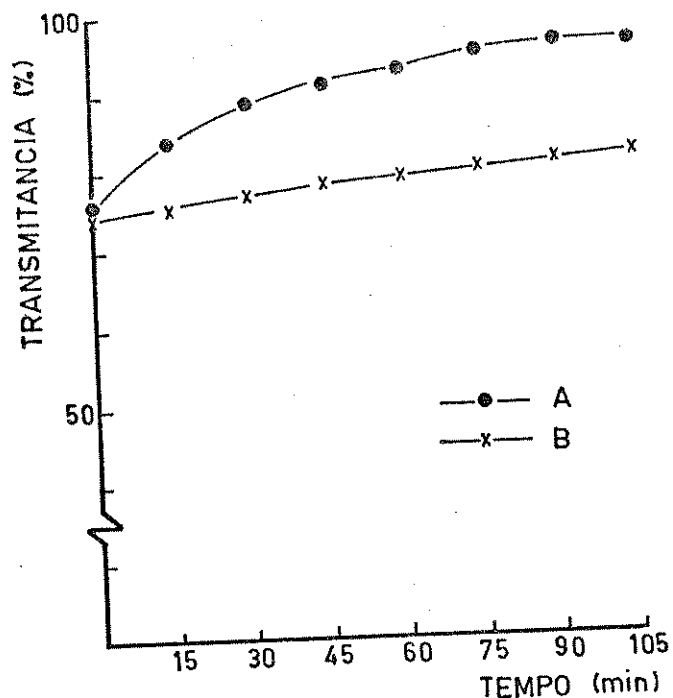


(7) *Pterodon pubescens* (Folhas)

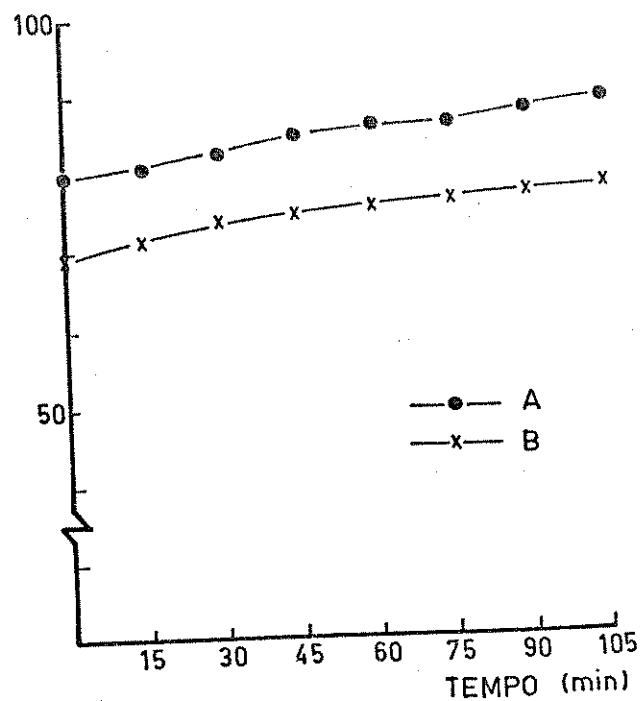


(8) *Pterodon pubescens* (Casca)

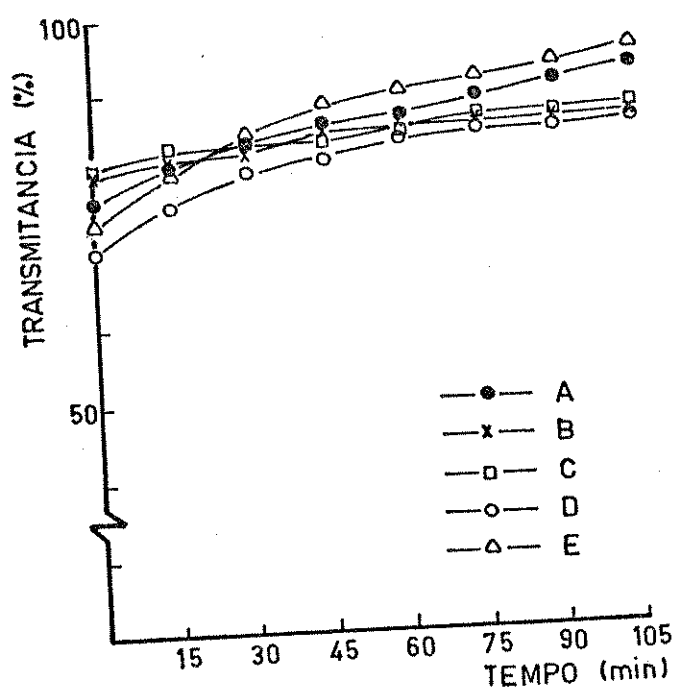
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



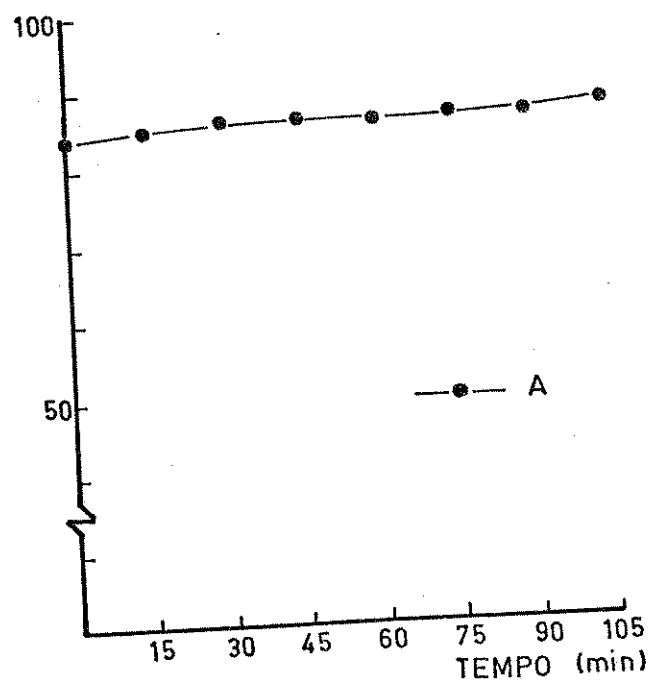
(9) *Centrolobium tomentosum* (Casca)



(10) *Indigofera truxillensis* (Planta inteira)

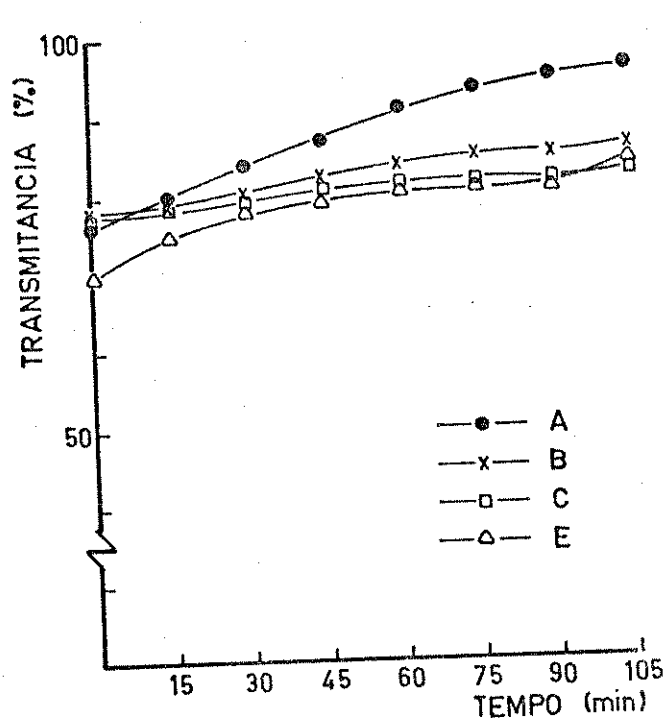


(11) *Hymenaea courbaril* (Frutos)

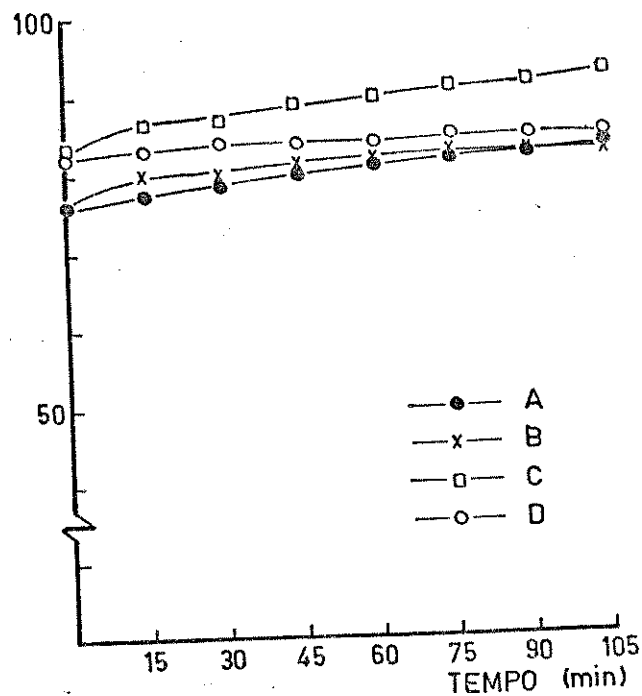


(12) *Cassia chrysocarpa* (Raiz)

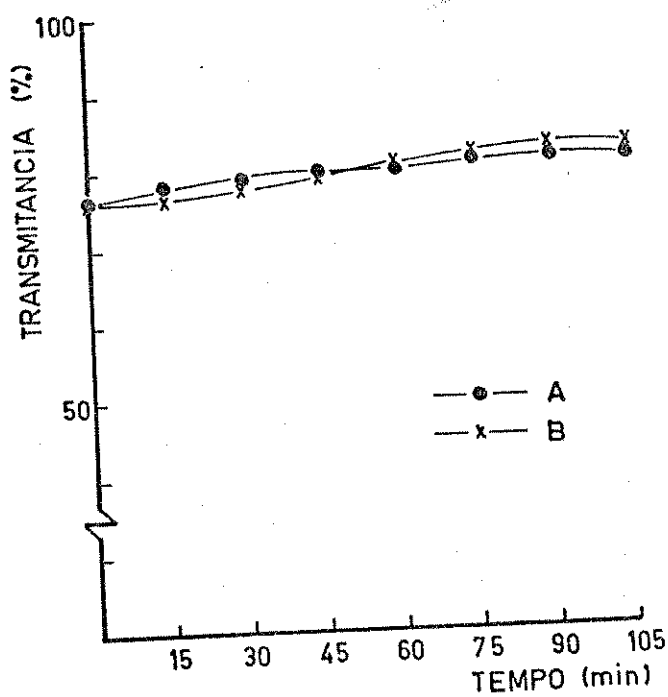
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



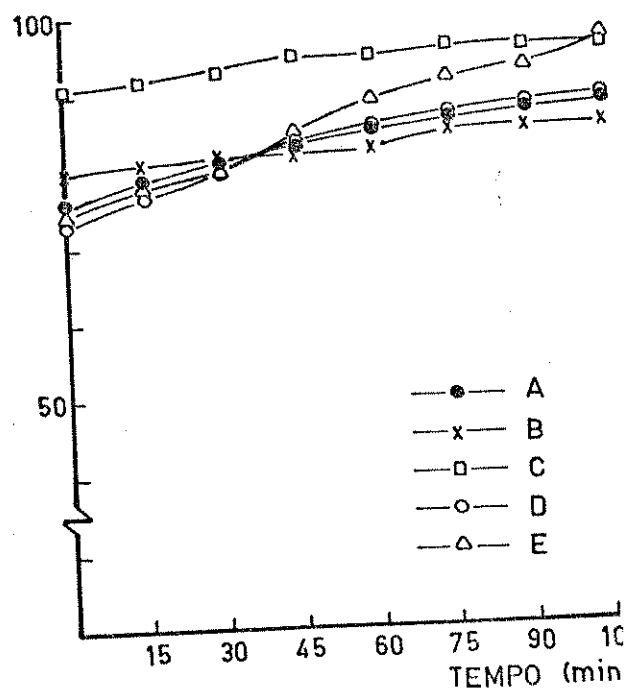
(13) *Vanillosmopsis erythropappa* (Madeira)



(14) *Piptocarpha macropoda* (Casca)

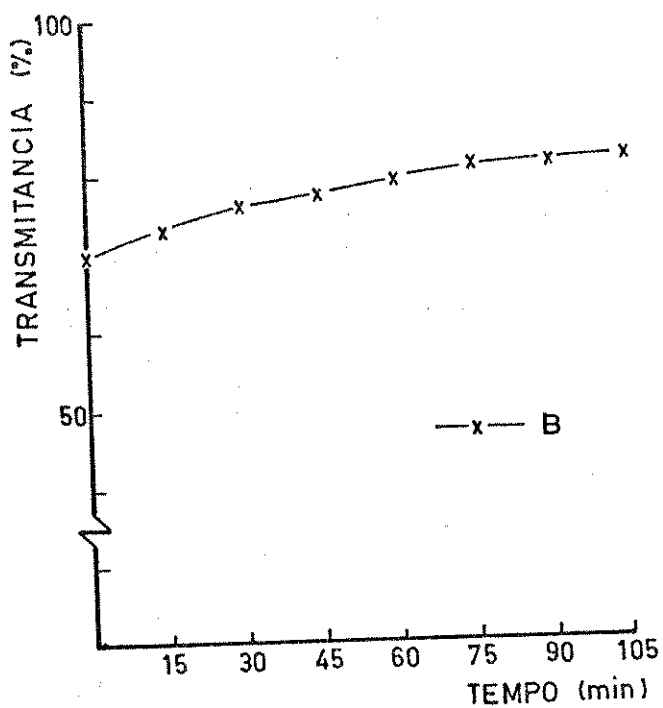


(15) *Mikania smilacina* (Folhas)

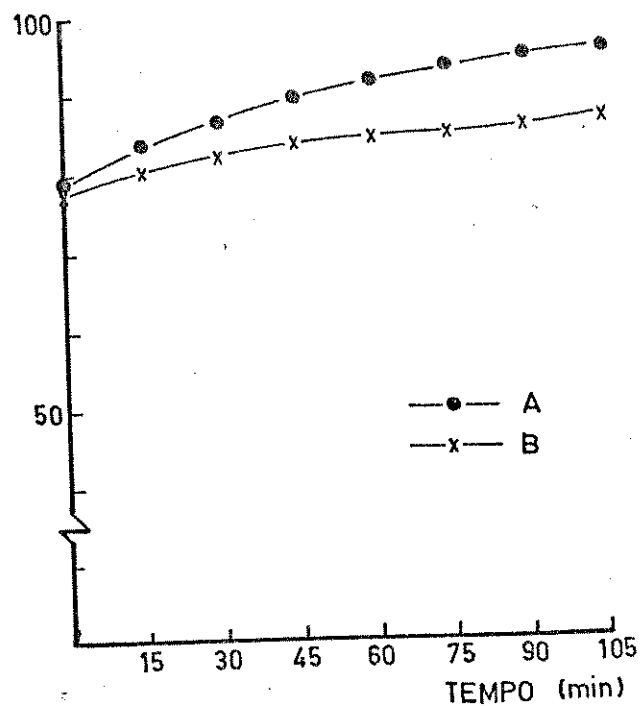


(16) *Vernonia diffusa* (Folhas e galho)

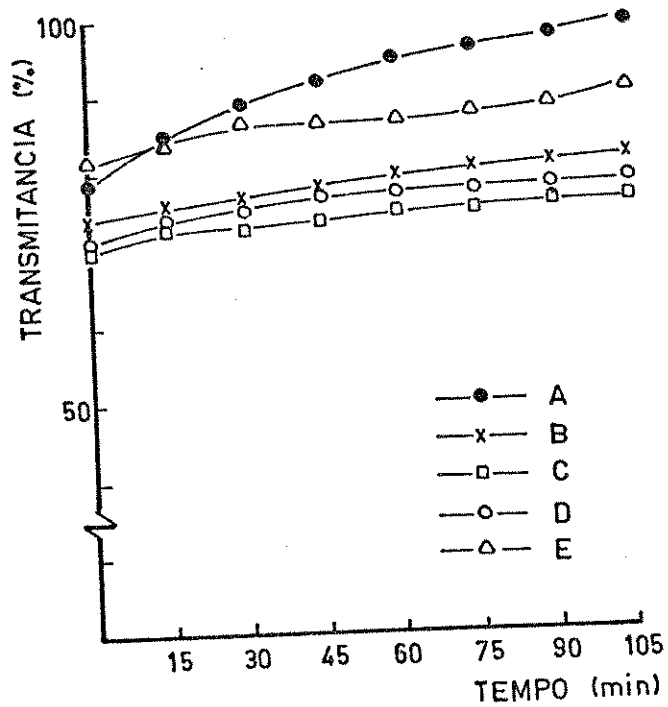
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



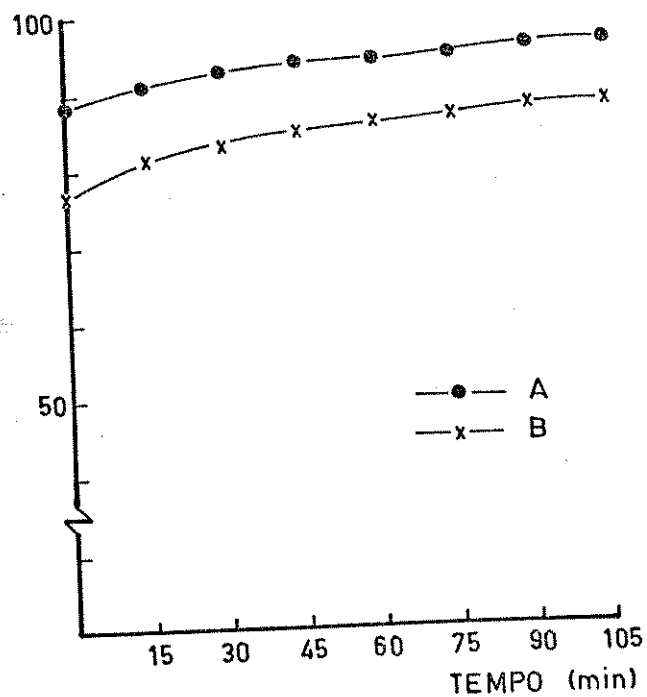
(17) Ambrosia artemisaefolia
(Planta inteira)



(18) Senecio icoglossus (Planta inteira)

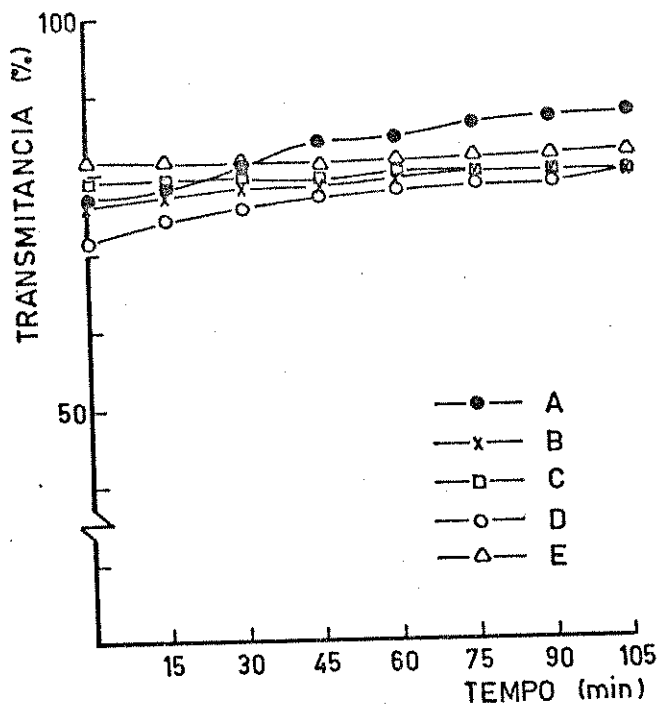


(19) Baccharis trimera (Planta inteira)

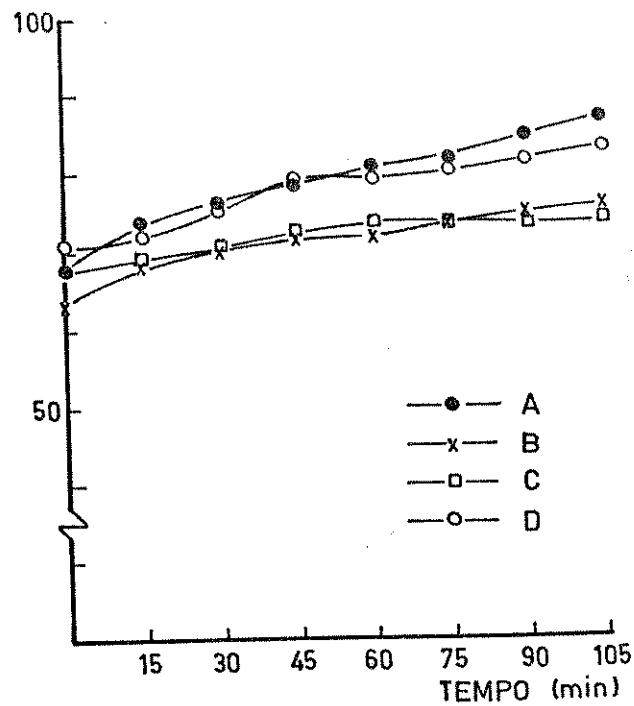


(20) Baccharis dracunculifolia
(Planta inteira)

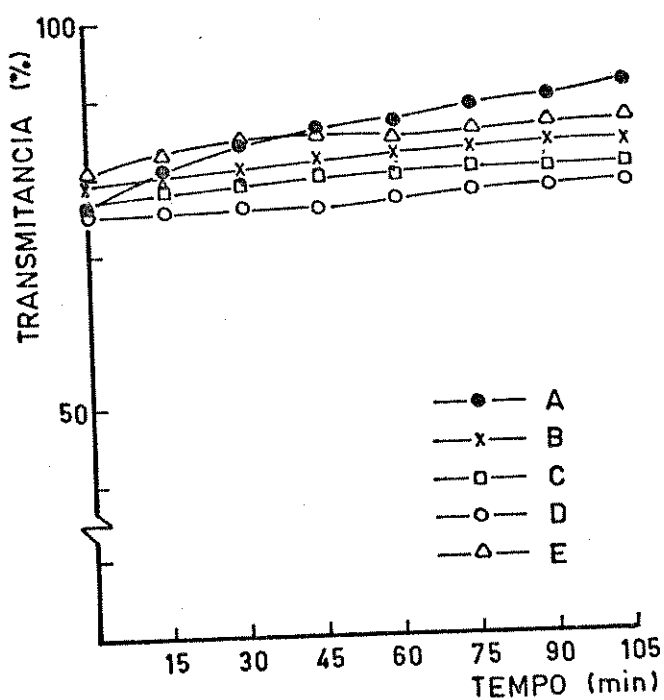
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



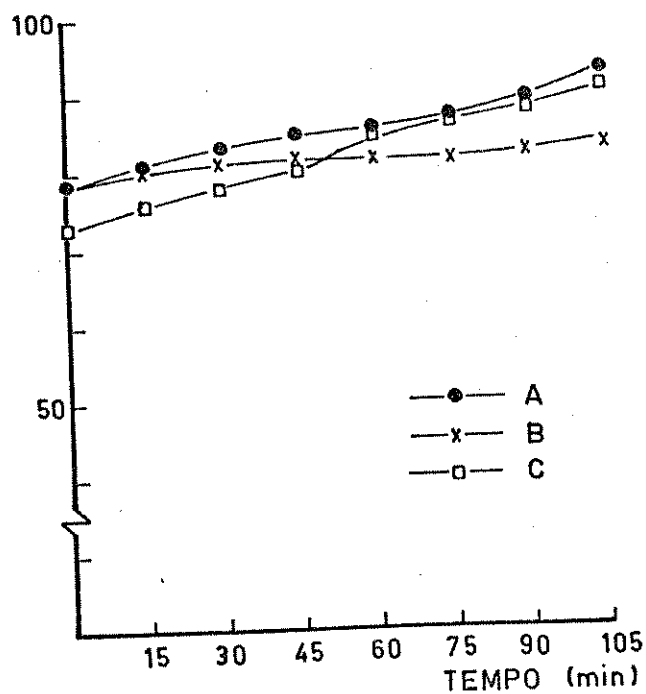
(21) *Byrsonima variabilis* (Folhas e galhos)



(22) *Banisteria argyrophylla* (Raiz)

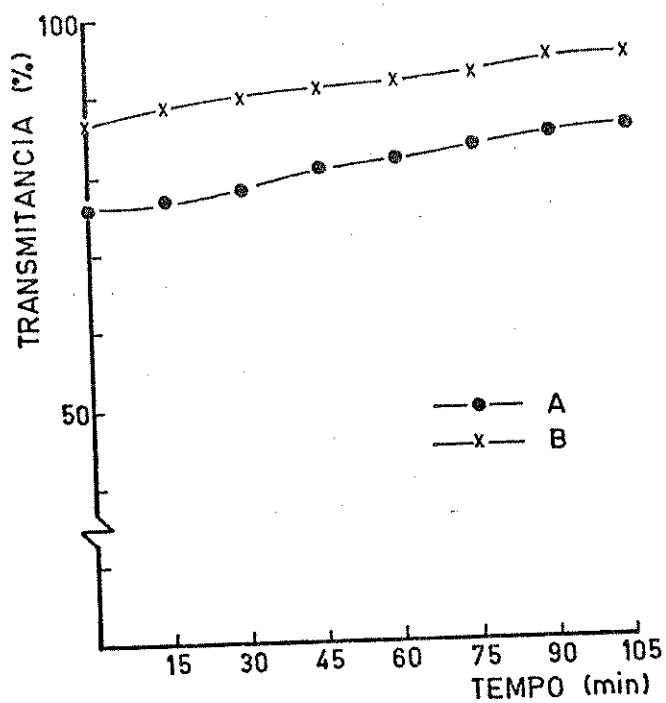


(23) *Casearia sylvestris* (Folhas)

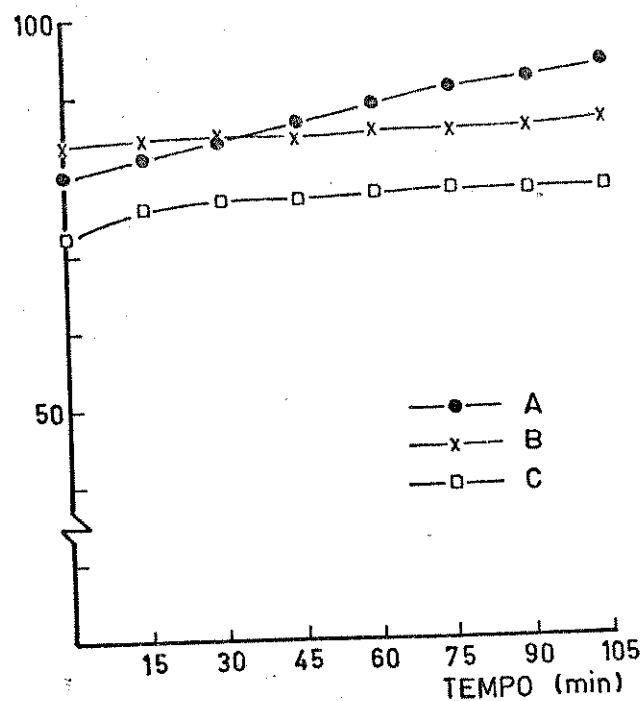


(24) *Fogara rhoifolia* (Folhas)

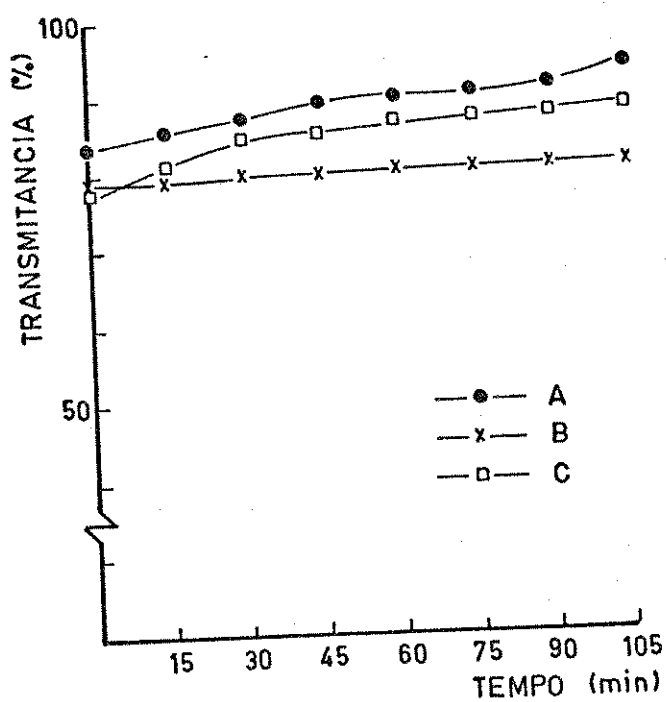
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



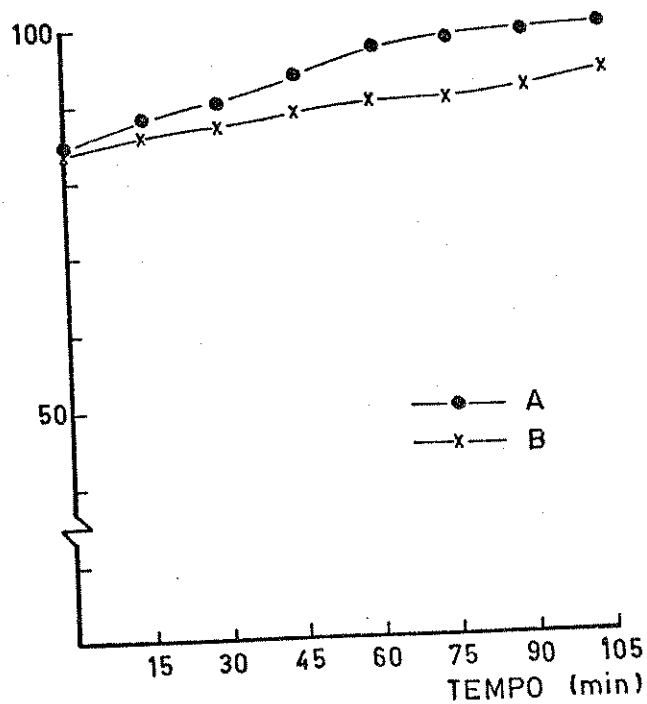
(25) *Fogara rhoifolia* (Casca)



(26) *Cochlospermum insigne* (Raiz)

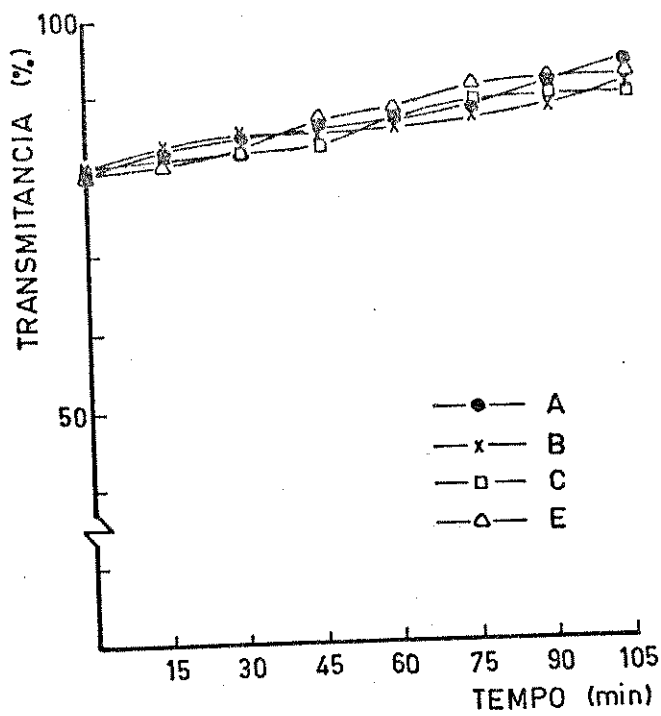


(27) *Aspidosperma nemorale* (Casca)

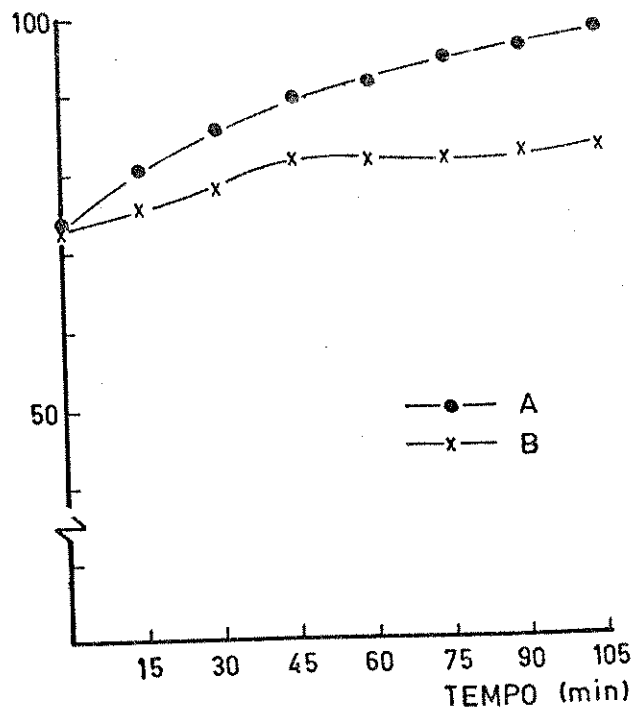


(28) *Peschiera montana* (Casca)

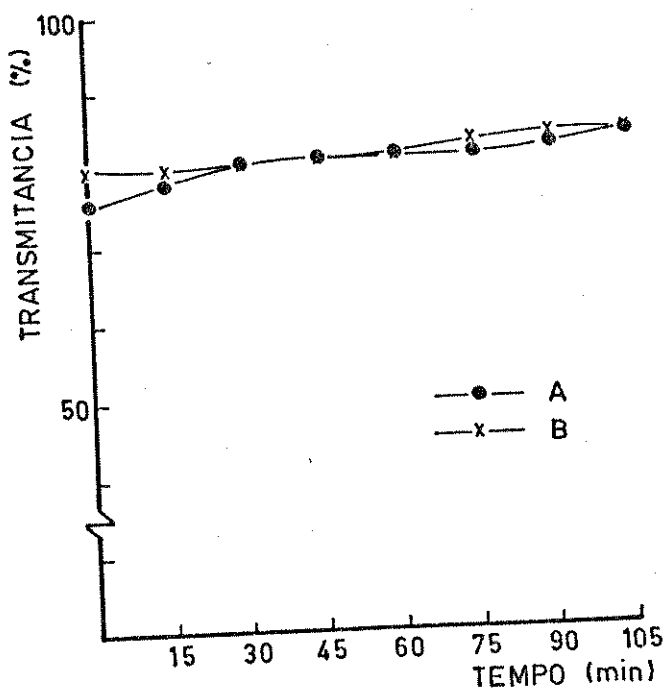
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



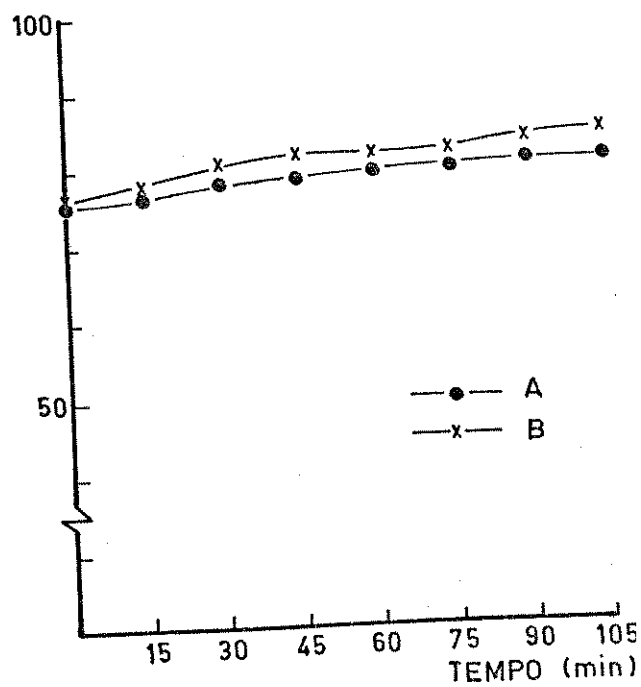
(29) *Coleus barbatifolius* (Folhas)



(30) *Cecropia peltata* (Folhas)

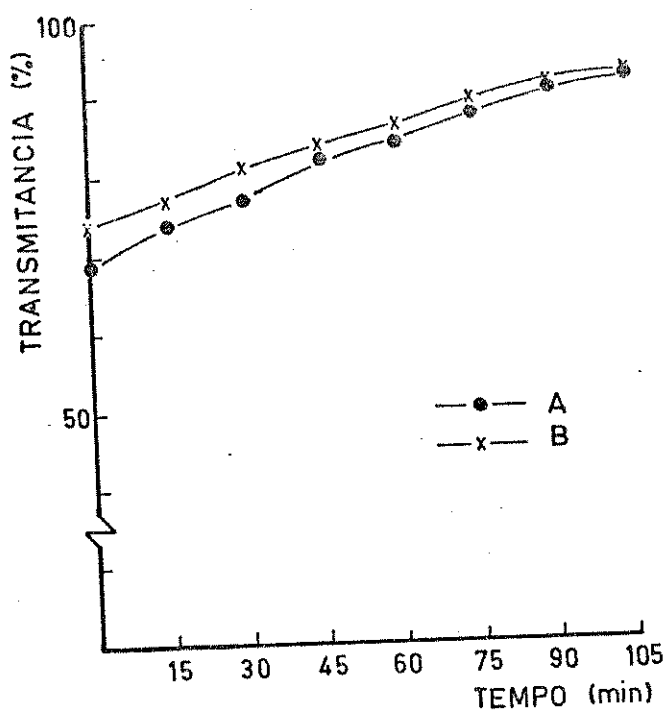


(31) *Solanum variabile* (Planta inteira)

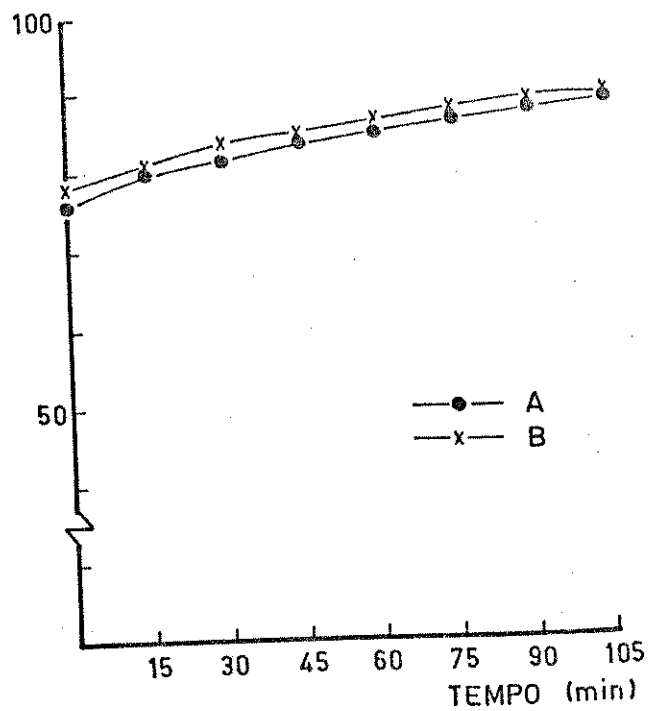


(32) *Solanum viarum* (Folhas e galhos)

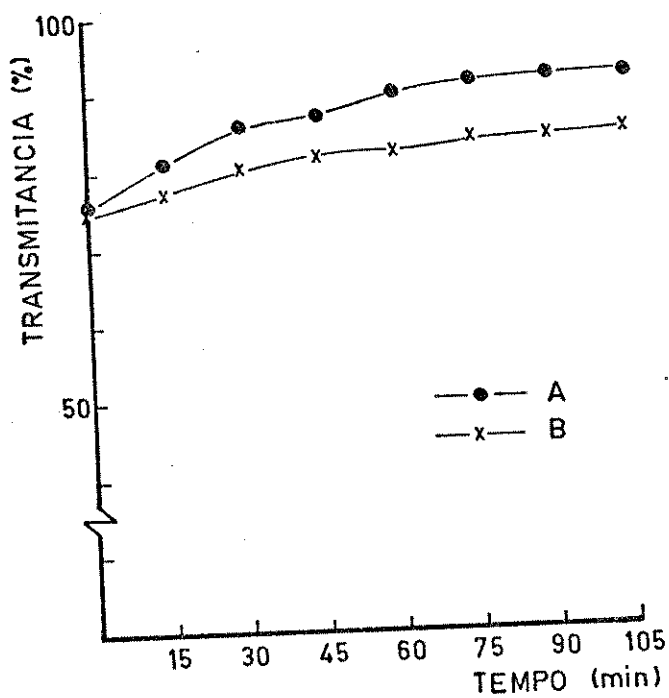
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



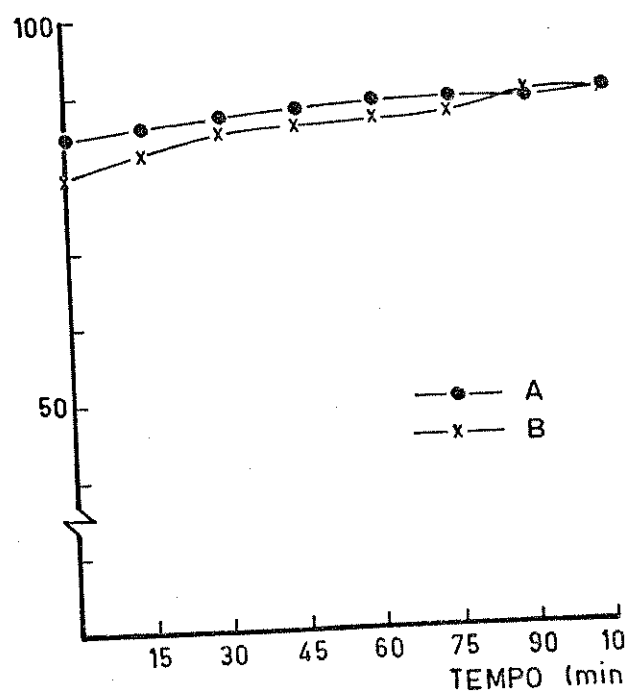
(33) Datura suaveolens
(Casca, folhas e sementes)



(34) Datura candida (Folhas)

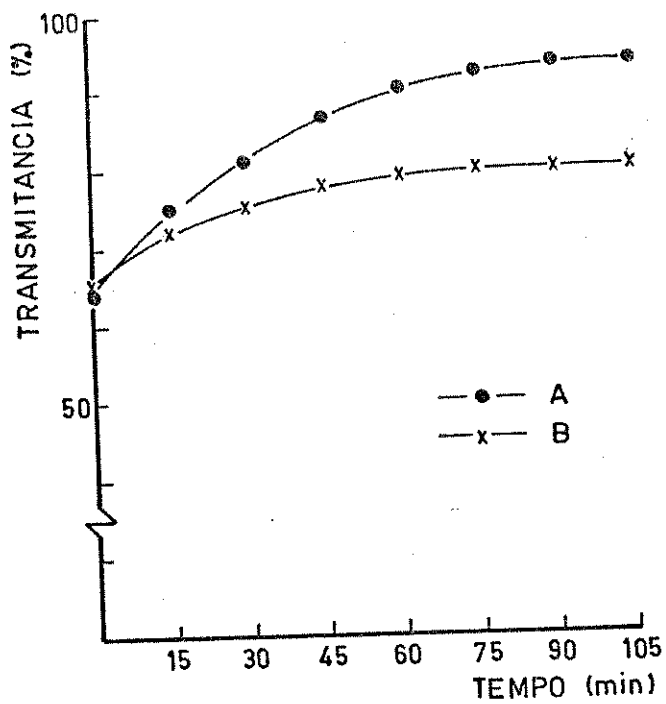


(35) Datura metel (Folhas)

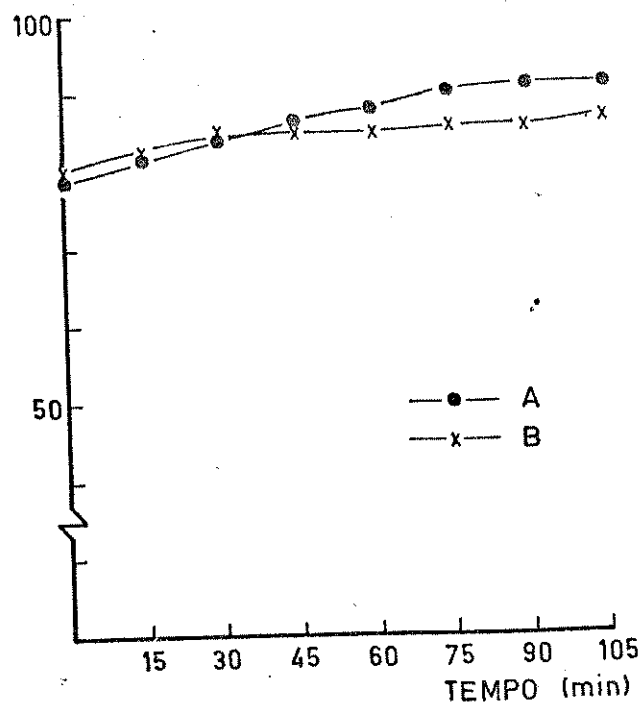


(36) Datura cariolusis (Folhas)

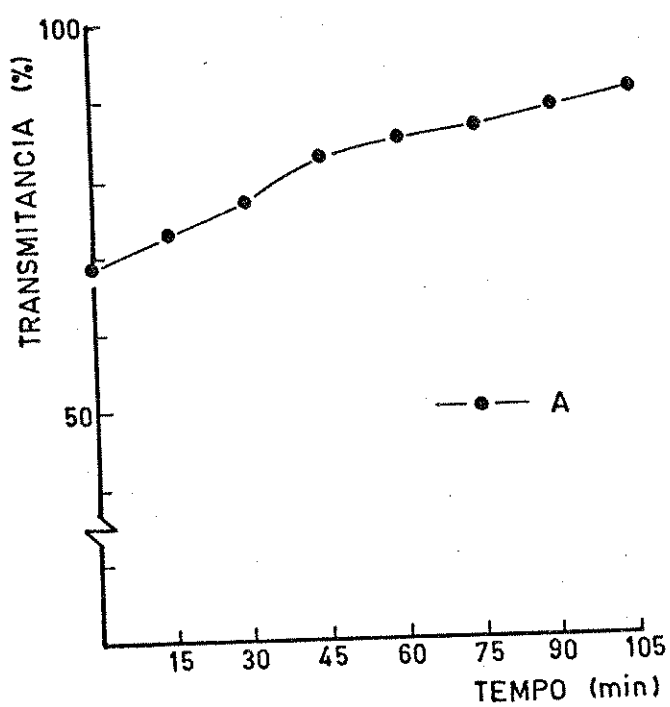
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



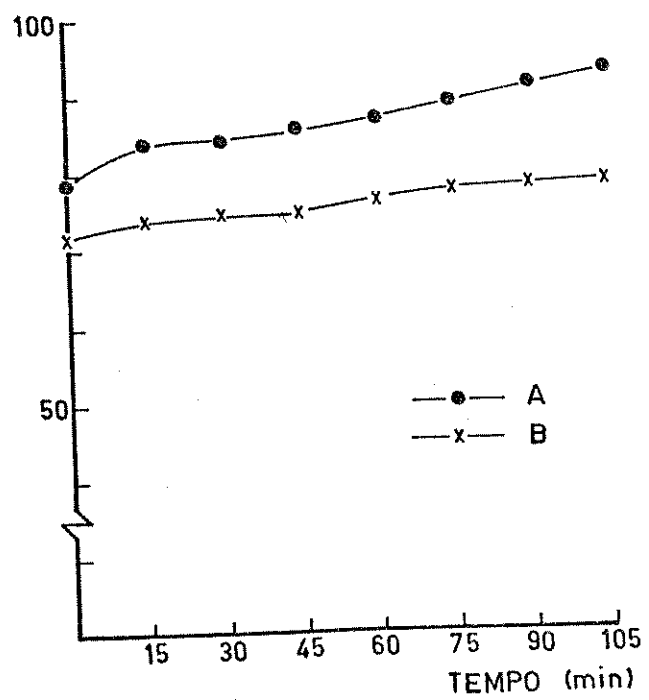
(37) *Aloe vera* (Folhas)



(38) *Equisetum martii* (Planta inteira)

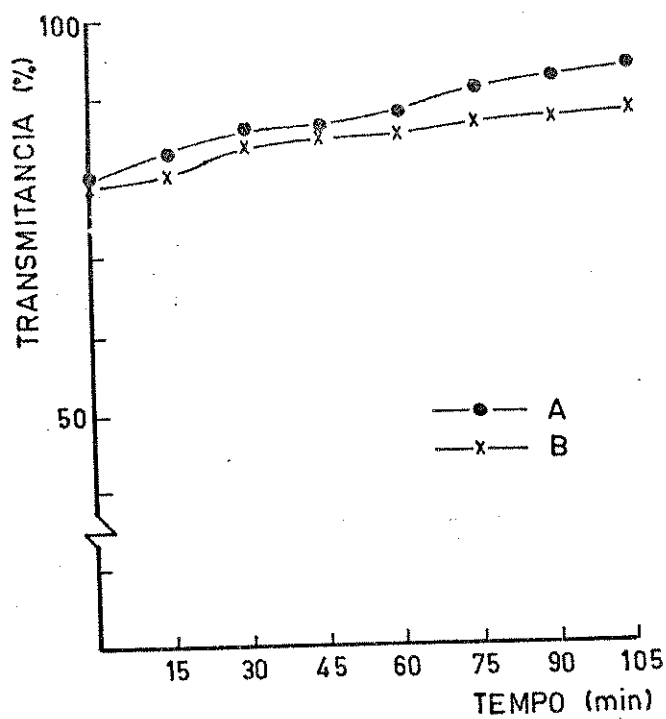


(39) *Psychotria pallens* (Folhas)

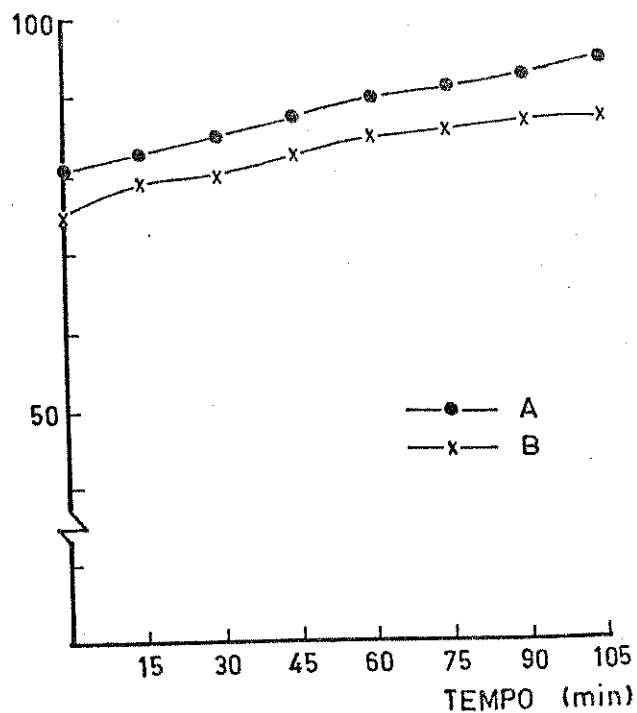


(40) *Petiveria tetrandra* (Planta inteira)

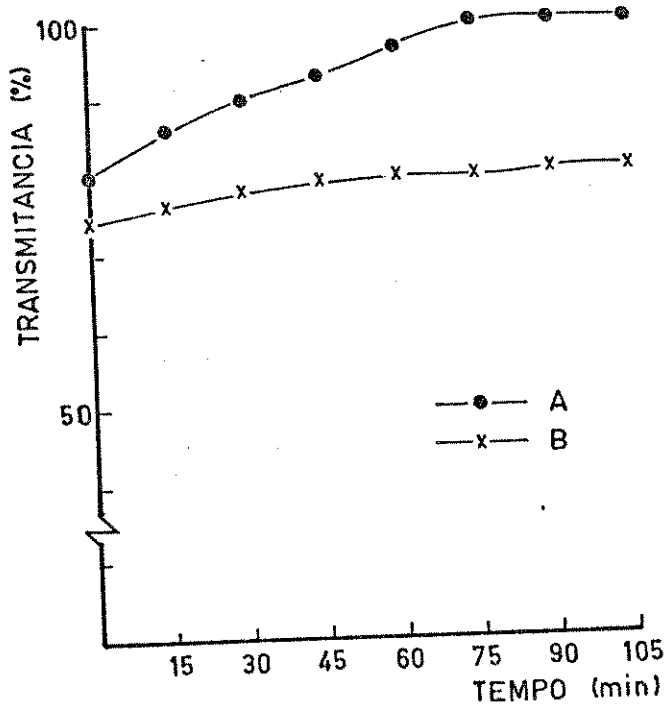
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



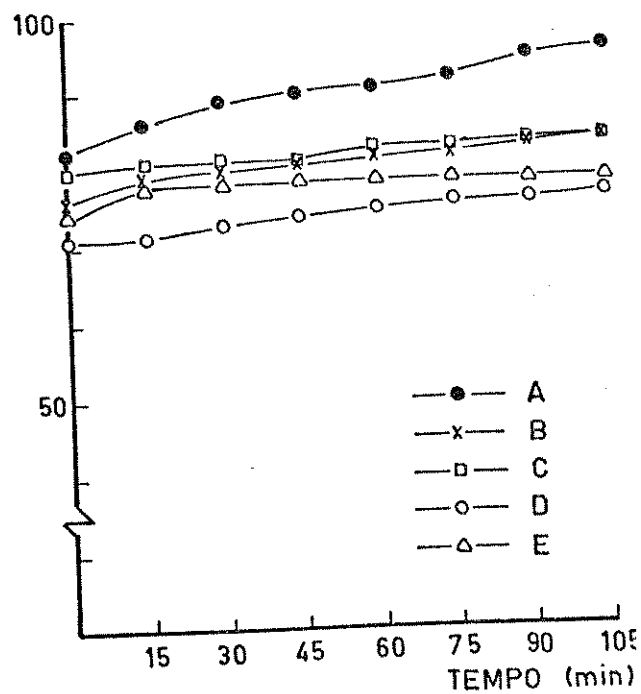
(41) *Galesia gorarema* (Casca)



(42) *Tillandsia usneoides* (Planta inteira)

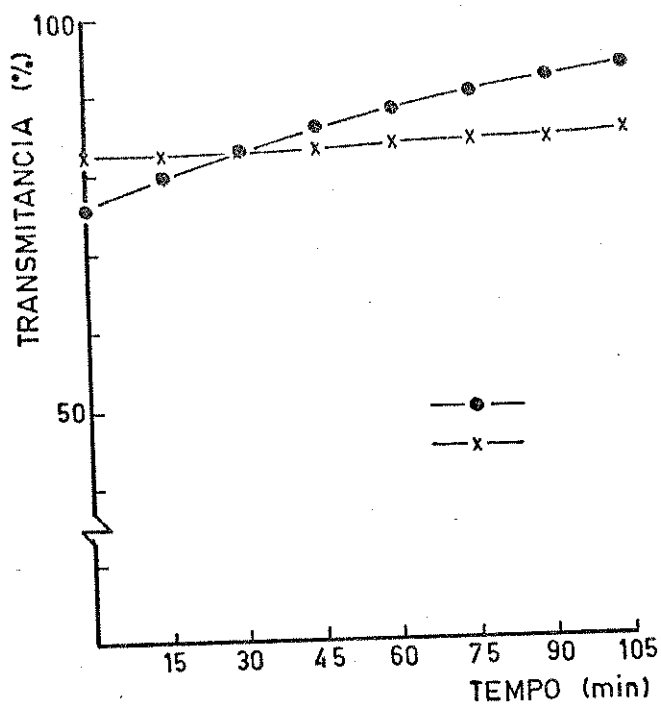


(43) *Luehea grandiflora* (Folhas)

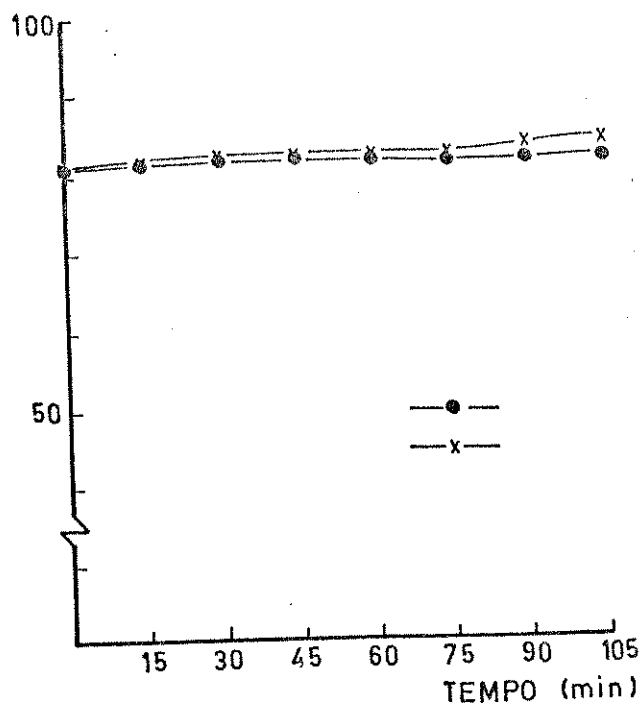


(44) *Triumfetta bartramia* (Planta inteira)

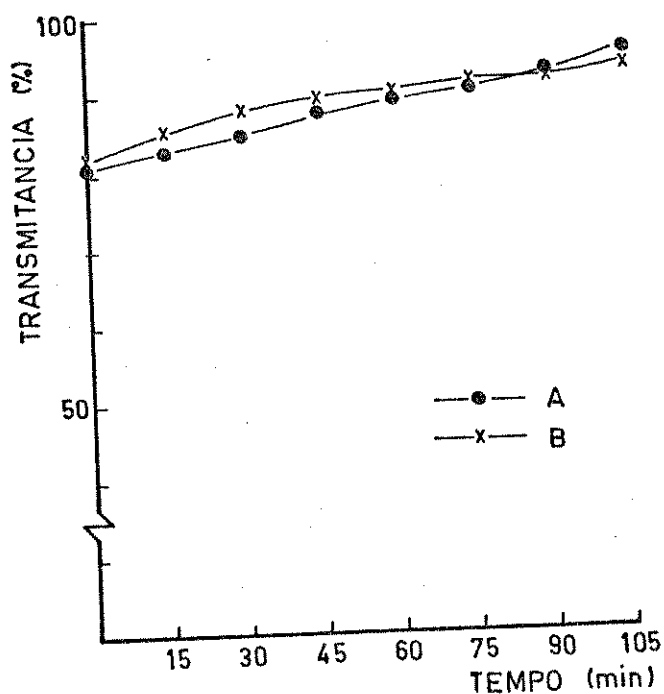
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



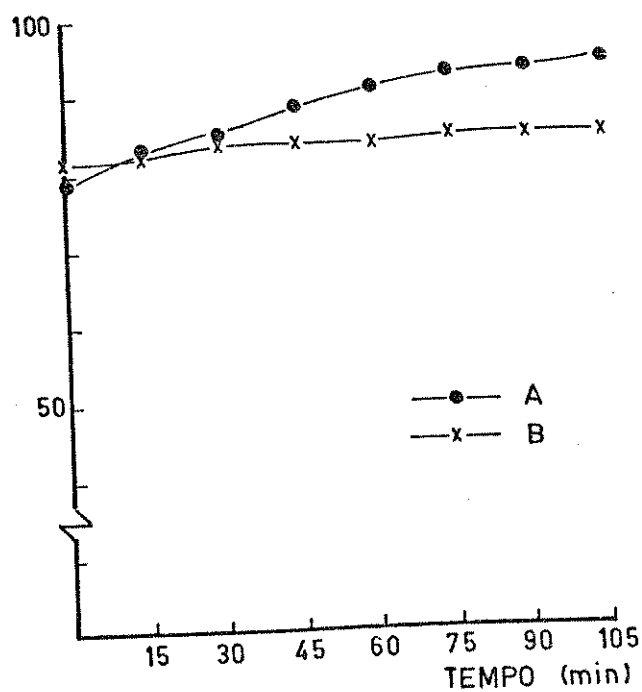
(45) *Cupania* sp. (Folhas e galhos)



(46) *Mirabilis jalapa* (Planta inteira)

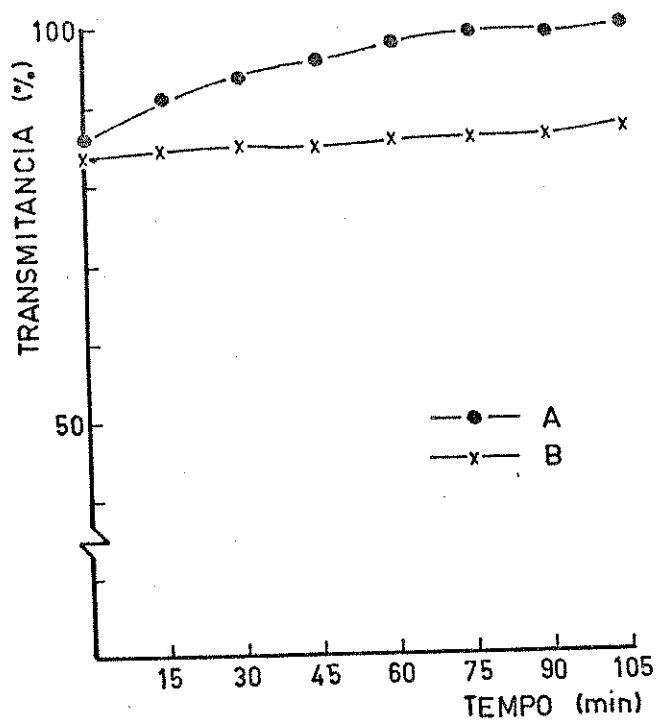


(47) *Argemone mexicana* (Planta inteira)

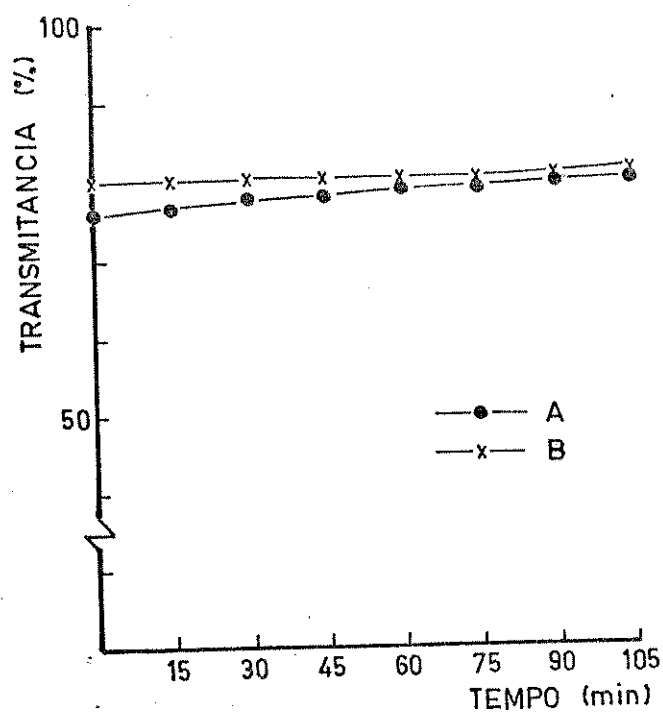


(48) *Lithraea molleoides* (Folhas e frutos)

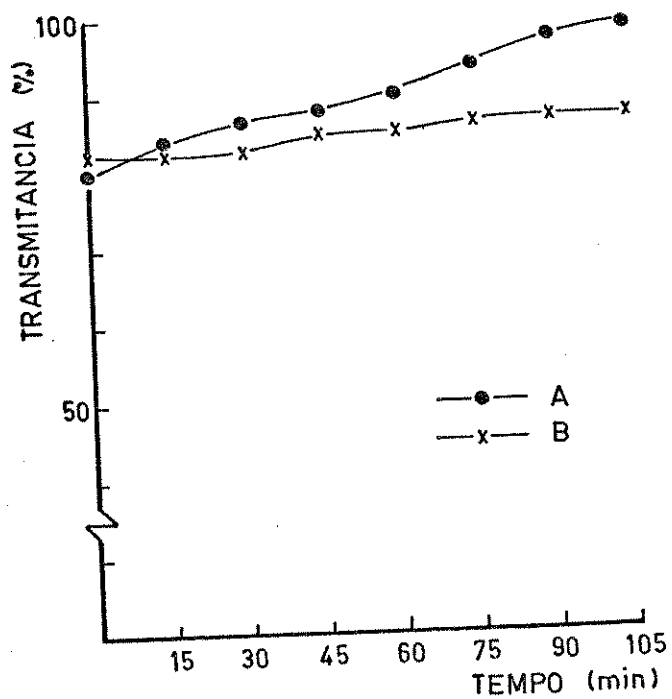
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)



(49) *Callophyllum brasiliensis*
(Folhas e galhos)



(50) *Sapium biglandulosum* (Folhas)



(51) *Johannesia princeps* (Sementes)

FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante ... (continuação)

bem pouca atividade antioxidante, por exemplo, gráficos 10, extrato E do gráfico 16 e extrato A do gráfico 30.

Nenhum dos extratos apresentou alta proteção inicial, seguida de um aumento sensível na taxa de oxidação.

Das observações dos gráficos acima citados, acredita-se que o tempo do teste para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos é muito longo e poderia ser encurtado para 60 min. sem perigo de uma avaliação incorreta, e sem alterar o critério de seleção usado neste caso ($\Delta\%T$).

Comparando o desempenho de extratos obtidos da mesma planta, porém de partes diferentes, observa-se que extratos A de folhas de *Stryphnodendron barbatiman* (gráficos 1 e 2) e *Fogara rhoifolia* (24 e 25) têm menor atividade que os de cascas, enquanto que em *Piptadenia macrocarpa* (gráficos 3 e 5) tem atividade similar, porém todos estes extratos (Folhas e casca) mostram curvas com inclinação acentuada, sendo pouco ativos, com exceção do extrato de casca de *Stryphnodendron*.

Os extratos B destas mesmas plantas em folhas e casca apresentam inclinação menor, sendo mais ativos, mas sem diferenças entre eles, o mesmo ocorrendo em extratos de *Pterodon pubescens* (Gráficos 7 e 8). Extratos C, D e E de casca e folhas de *Piptadenia macrocarpa* (Gráficos 3, 5) mostram atividades similares.

Extratos (A,B,C,D,E) de casca, raiz e folhas de *Piptadenia macrocarpa* (Gráficos 3, 4 e 5) apresentam igual comportamento.

Salvo poucas exceções (Gráficos 20, 32, 36 e 46) os extratos A têm menor atividade que os B na mesma planta.

A análise dos gráficos com respeito aos outros tipos de extrato (B,C,E) na mesma planta, não proporciona nenhuma tendência geral, dependendo inteiramente da planta usada.

Os extratos D, excetuando os de *Piptocarpha macropoda* e *Caseária sylvestris* (Gráficos 14 e 25), mostram curvas similares aos extratos A, oferecendo pouca proteção ao sistema.

Plantas do mesmo gênero mostraram atividade diferente, por exemplo no gênero *Datura* extratos B (Gráficos 34, 35 e 36) tem atividade similar, porém extratos A de *D. metel* e *D. candida* tiveram baixa atividade enquanto em *D. caribolusis* a capacidade antioxidante foi alta.

Pelas observações dos gráficos parece que a atividade antioxidante, depende principalmente da forma como foram elaborados os extratos, e em menor grau da parte da planta utilizada, isto pode ser devido a que a forma de preparação separa compostos similares em cada extrato, com provável concentração de substâncias ativas.

Na Tabela 2 é mostrado o índice antioxidante $\Delta\%T$, escolhido para avaliação dos extratos, segundo o critério descrito no capítulo de Materiais e Métodos (1a. etapa-Seleção). Por este critério foram selecionados nesta etapa 42 extratos, que apresentaram índices $\Delta\%T$ menor ou igual a 5.

Por observação das testemunhas, ocorridas junto aos extratos, pode se generalizar, que índices $\Delta\%T \leq 5$ significa alta potência antioxidante, valores entre 10 e 15 indicam pouca ou nenhuma atividade antioxidante, enquanto índices superiores a 15 mostram atividade pró-oxidante.

Na Tabela 3, elaborada a partir dos dados da tabela anterior (Tabela 2), mostra-se o comportamento dos extratos, segundo o modo como eles são obtidos (Figura 1 Materiais e Métodos).

TABELA 2 - Teste de capacidade antioxidante dos extratos no sistema modelo de β -caroteno-Ác. linoleico (1ª Etapa-Seleção)

PLANTA	PARTE USADA	EXTRATO	$\Delta\%T^*$	
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	(1) Folhas	A	9	
		B	5	
		C	7	
		D	15	
		E	2	
	(2) Casca	A	5	
		B	4	
	<i>Piptadenia macrocarpa</i>	(3) Casca	A	19
			B	3
			C	3,5
D			8	
E			3	
	(4) Raiz	A	18	
		B	2	
		C	3	
	(5) Folhas	A	15	
		B	3	
C		4		
D		7		
E		6		
<i>Pterodon pubescens</i>	(6) Raiz	A	22	
		B	9	
	(7) Folhas	A	20	
		B	7,5	
	(8) Cascas	B	0	
C		6		
D		13		
E		3		
<i>Centrolobium tomentosum</i>		(9) Casca	A	20
	B		8	
<i>Indigofera truxillensis</i>	(10) Planta inteira	A	9	
		B	9	

TABELA 2 - Teste de capacidade antioxidante ... (continuação)

PLANTA	PARTE USADA	EXTRATO	$\Delta\%T^*$
<i>Hymenaea courbaril</i>	(11) Frutos	A	16
		B	7
		C	7
		D	16
		E	22
<i>Cassia chrysocarpa</i>	(12) Raiz	A	4
<i>Vanillosmopsis erythropappa</i>	(13) Madeira	A	19
		B	8
		C	5
		E	13
<i>Piptocarpha macropoda</i>	(14) Casca	A	7
		B	5
		C	8,5
		D	2
<i>Mikania smilacina</i>	(15) Folhas	A	4
		B	7
<i>Vernonia diffusa</i>	(16) Folhas e galhos	A	12
		B	6
		C	5
		D	15
		E	22
<i>Ambrosia artemisaefolia</i>	(17) Planta inteira	B	12
<i>Senecio icoglossus</i>	(18) Planta inteira	A	15,5
		B	8,5
<i>Baccharis trimera</i>	(19) Planta inteira	A	20
		B	8
		C	7
		D	7
		E	8
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	(20) Planta inteira	A	8
		B	11
<i>Byrsonima variabilis</i>	(21) Folhas e galhos	A	10
		B	4
		C	1
		D	8
		E	0

TABELA 2 - Teste de capacidade antioxidante ... (continuação)

PLANTA	PARTE USADA	EXTRATO	$\Delta\%T^*$
<i>Banisteria argyrophylla</i>	(22) Raiz	A	19
		B	13
		C	6
		D	13
<i>Casearia sylvestris</i>	(23) Folhas	A	15
		B	5
		C	4
		D	4
		E	6
<i>Fogara rhoifolia</i>	(24) Folhas	A	14
		B	4
	(25) Cascas	C	18
		A	9
		B	8
<i>Cochlospermum insigne</i>	(26) Raiz	A	14
		B	5
		C	5
<i>Aspidosperma nemorale</i>	(27) Cascas	A	10
		B	2
		C	10
<i>Peschiera montana</i>	(28) Cascas	A	15
		B	10
<i>Coleus barbatus</i>	(29) Folhas	A	13
		B	10
		C	9
		E	11
<i>Cecropia peltata</i>	(30) Folhas	A	24
		B	10
<i>Solanum variabile</i>	(31) Planta inteira	A	8
		B	5
<i>Solanum viarum</i>	(32) Folhas e galhos	A	4,5
		B	8,5
<i>Datura suaveolens</i>	(33) Casca, folhas e sementes	A	22,5
		B	18

TABELA 2 - Teste de capacidade antioxidante ... (continuação)

PLANTA	PARTE USADA	EXTRATO	$\Delta\%T^*$
<i>Datura candida</i>	(34) Folhas	A	12,5
		B	11
<i>Datura metel</i>	(35) Folhas	A	16
		B	10
<i>Datura cariolusis</i>	(36) Folhas	A	5
		B	11
<i>Aloe vera</i>	(37) Folhas	A	29
		B	15
<i>Equisetum martii</i>	(38) Planta inteira	A	12
		B	7
<i>Psychotria pallens</i>	(39) Folhas	A	22
<i>Petiveria tetrandia</i>	(40) Planta inteira	A	13,5
		B	6,5
<i>Gallesia gorarema</i>	(41) Cascas	A	14
		B	9
<i>Tillandsia usneoides</i>	(42) Planta inteira	A	14
		B	12
<i>Luehea grandiflora</i>	(43) Folhas	A	20
		B	7
<i>Triumfetta bartramia</i>	(44) Planta inteira	A	13
		B	7
		C	4
		D	6
		E	4
<i>Cupania sp.</i>	(45) Folhas e galhos	A	17
		B	2,5
<i>Mirabilis jalapa</i>	(46) Planta inteira	A	1
		B	3
<i>Argemone mexicana</i>	(47) Planta inteira	A	14,5
		B	11,5
<i>Lithraea molleoides</i>	(48) Folhas e frutos	A	15
		B	3
<i>Callophyllum brasiliensis</i>	(49) Folhas e galhos	A	14
		B	3

TABELA 2 - Teste de capacidade antioxidante ... (continuação)

PLANTA	PARTE USADA	EXTRATO	$\Delta\%T^*$
<i>Sapium biglandulosum</i>	(50) Folhas	A	4
		B	2
<i>Johannesia princeps</i>	(51) Sementes	A	19
		B	5

* $\Delta\%T$ = transmitância no tempo 105 min - transmitância no tempo 0 min.

TABELA 3 - Comportamento dos extratos como antioxidantes, segundo sua forma de preparação (*) no sistema modelo β -caroteno-ác. linoleico.

EXTRATO	Nº de extratos testados	Nº de extratos com		Nº de extratos com		Nº de extratos com	
		$\Delta\%T \leq 5(\%)$		$\Delta\%T \leq 10(\%)$		$\Delta\%T > 10(\%)$	
A	49	7	(14,3)	15	(30,6)	34	(69,4)
B	49	19	(38,8)	40	(81,6)	9	(18,4)
C	18	9	(50,0)	17	(94,4)	1	(5,6)
D	12	2	(16,7)	7	(58,3)	5	(41,7)
E	12	5	(41,2)	8	(66,7)	4	(33,3)
TOTAL	140	42	(30,0)	87	(62,1)	53	(37,9)

(*) Vide Figura 1

A partir dos dados desta tabela, pode-se observar que os extratos mais ativos neste sistema são os C, seguidos dos E e B, enquanto os extratos A são os que mostraram poder antioxidante, com menor frequência.

Na tabela 4 mostra-se o índice $\Delta\%T$ de algumas substâncias fenólicas, muitas das quais com reconhecido poder antioxidante. Observa-se que exceto a naringina e o ácido ferúlico, todas as substâncias testadas mostram índices ($\Delta\%T$) menores que 5 neste sistema, sendo as mais ativas: quercitina, morina e esculetina.

A atividade antioxidante de algumas destas substâncias previamente pesquisadas neste sistema (β -caroteno-ác. linoleico) é equivalente à encontrada neste trabalho.

PRATT & BIRAC (1979) reportam que a quercitina, ácido cafeico e ác. clorogênico possuem uma alta atividade antioxidante, enquanto que o ácido ferúlico mostrou uma baixa atividade, um pouco maior à observada. WHITTERN *et alii* (1984) citaram que a rutina possui uma menor atividade que a quercitina, usando um sistema de β -caroteno-banha adicionada de uma solução aquosa do flavonóide. PRATT & WATTS (1964) mostram que a catequina tem menor atividade que a quercitina, enquanto que a miricetina tem uma atividade maior. PRATT (1965) reporta que num sistema de carne com solução aquosa do flavonóide, a quercitina tem melhor poder antioxidante que a miricetina, e que o ácido clorogênico não tem atividade antioxidante. Neste mesmo artigo é relatado um fato interessante: o ácido cafeico tem uma alta atividade antioxidante, mas esta depende da fonte e da forma de obtenção, por exemplo: o ácido cafeico, obtido por cromatografia em papel, de um extrato de pele de batatas, tem maior atividade do que quando obtido de sementes de pimenta, enquanto que o ácido cafeico grau químico é melhor antioxidante que os outros dois no mesmo sistema.

TABELA 4 - Teste de capacidade antioxidante de algumas substâncias fenólicas (*) no sistema modelo de β -caroteno-ácido linoleico.

Substância**	$\Delta\%T$	Marca
BHT	4	Fluka
BHA	3	"
Ascorbil palmitato (AP)	3	Roche
Propil galato (PG)	3	Fluka
Ácido gálico	5	Carlo Erba
Ácido tânico	4	Merck
Ácido cafeico	3	Fluka
Ácido hidrocafeico	3	Fluka
Ácido ferúlico	14,5	"
Quercitina	1	Merck (3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavona)
Rutina	4,5	Fluka (quercitin 3-rutinosido)
Miricetina	3	Fluka (3,3',4',5,5',7-hexa-hidroxiflavona)
Apigenina	3	" " (4',5,7-tri-hidroxiflavona)
Naringina	9	Fluka (naringenin 7-rhamosido)
Morina	1	Merck (2',3,4',5,7 - penta-hidroxiflavona)
Esculetina	1	Fluka (6,7-di-hidroxicoumarina)
Catequina	4	Fluka (3,3',4',5,7 - penta-hidroxiflavol)
Testemunha	15	-

(*) O ascorbil palmitato (AP) embora não seja um composto fenólico foi incluído devido a sua reconhecida ação antioxidante.

(**) 2 mg em 2 ml de metanol adicionados a 50 mL de água.

Além desses sistemas aquosos, outros têm sido usados para avaliar a potência antioxidante de flavonóides e extratos de plantas (NAIM *et alii* 1976; GYORGY *et alii* 1964; LETAN, 1966 b.), mas os resultados não podem ser comparados pela dependência direta entre atividade antioxidante e os sistemas e métodos usados na avaliação. (DZIEDZIC & HUDSON, 1983a; HUDSON & LEWIS 1983a).

Confirmação (2a. Etapa)

A Tabela 5 mostra os resultados do índice de peróxido (IP) de óleo de soja, quando adicionou-se cada um dos 42 extratos selecionados e BHT, obtendo-se o índice Δ IP, como indicador da atividade antioxidante.

Valores Δ IP maiores que 0, indicam potência antioxidante maior que o BHT, sempre levando-se em conta, que foram adicionados 50 mg do extrato, em comparação com 5 mg de BHT. Em geral, valores Δ IP entre 0 e -20, significam média e baixa capacidade antioxidante, e valores menores de -20 mostram extratos agindo como pró-oxidantes neste sistema lipídico.

Observa-se que não existe nenhuma correlação entre os índices Δ %T da 1a. etapa e Δ IP nesta etapa, portanto, a atividade antioxidante dos extratos no sistema lipídico parece ser independente da capacidade mostrada no sistema aquoso de β -caroteno-ácido linoleico. Este fato de diferente capacidade antioxidante para a mesma substância ou extrato em sistemas diferentes, já foi comentada nos resultados da primeira etapa (Seleção). Porém, a validade do teste no sistema modelo não é discutida, já que no presente caso proporciona uma maneira rápida e fácil de selecionar os extratos que tinham maiores atividades antioxidantes.

TABELA 5 - Teste da capacidade antioxidante dos extratos em óleo de soja a 110°C x 3 hs, 20L/min ar. (2a. Etapa - Confirmação).

Planta	Parte usada	Extrato	Δ%T (1)	IP (2) BHT	IP (3) Extrato	IP (4) Óleo	ΔIP (5)
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Folhas	B	5	32,4	27,8	63,4	4,6
	"	E	2	32,2	21,8	57,6	10,4
	Casca	A	5	33,5	15,1	56,8	18,4
	"	B	4	46,2	44,6	87,9	1,6
<i>Piptadenia macrocarpa</i>	Casca	B	3	46,2	56,4	87,9	-10,2
	"	C	3,5	35,9	83,6	56,0	-47,7
	"	E	3	32,2	37,9	57,6	- 5,7
	Raiz	B	2	32,4	42,6	63,4	-10,2
	"	C	3	35,9	20,6	53,0	15,3
	Folhas	B	3	46,2	22,8	87,9	23,4
<i>Pterodon pubescens</i>	"	C	4	35,9	29,9	53,0	6,0
	Casca	E	3	32,2	68,9	57,6	-36,7
	Raiz	A	4	28,0	30,9	56,7	- 2,9

TABELA 5 - Teste da capacidade antioxidante ... (continuação)

Planta	Parte usada	Extrato	$\Delta T(1)$	IP (2) BHT	IP (3) Extrato	IP (4) Óleo	IP (5)
<i>Vanillosmopsis erythropappa</i>	Madeira	C	5	35,9	62,0	53,0	-26,1
<i>Piptocarpha macropoda</i>	Casca	B	5	47,5	60,5	87,9	-13,0
	"	D	2	35,9	97,2	53,0	-61,3
<i>Mikania smilacina</i>	Folhas	A	4	33,5	16,3	56,8	17,2
<i>Vernonia diffusa</i>	Folhas e galhos	B	6	29,2	29,6	53,0	-0,4
	"	C	5	35,9	24,9	53,0	11,0
<i>Byrsonima variabilis</i>	Folhas e galhos	B	4	47,5	51,0	87,9	-3,5
	"	C	1	35,9	45,1	56,0	-9,2
	"	E	0	32,2	33,8	57,6	-1,6
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	B	5	28,1	52,7	57,6	-24,6
	"	C	4	35,9	66,5	53,0	-30,6
	"	D	4	35,9	367,1	53,0	-331,2

TABELA 5 - Teste da capacidade antioxidante ... (continuação).

Planta	Parte usada	Extrato	$\Delta T(1)$	IP (2) BHT	IP (3) Extrato	IP (4) Óleo	$\Delta IP(5)$
<i>Fogara rhoifolia</i>	Folhas	B	4	35,9	39,4	56,0	-3,5
<i>Cochlospermum insignne</i>	Raiz	B	5	35,0	41,3	71,4	-6,3
	" "	C	5	35,9	15,3	53,0	20,6
<i>Aspidosperma nemorale</i>	Casca	B	2	32,4	73,0	63,4	-40,6
<i>Solanum variabite</i>	Planta inteira	B	5	46,2	47,9	87,9	-1,7
<i>Solanum viarum</i>	Planta e galhos	A	4,5	28,0	13,3	56,7	14,7
<i>Datura cariolulusis</i>	Folhas	A	5	28,0	20,2	56,7	7,8
<i>Triumfetta bartramia</i>	Planta inteira	C	4	35,9	52,6	53,0	-16,7
	" "	E	4	32,2	27,8	57,6	4,4
<i>Cupania sp.</i>	Folhas e galhos	B	2,5	47,5	84,0	87,9	-36,5
<i>Mirabilis jalapa</i>	Planta inteira	A	1	28,0	30,9	56,7	-2,9

TABELA 5 - Teste da capacidade antioxidante (continuação)

Planta	Parte usada	Extrato	$\Delta\%T(1)$	IP (2) BHT	IP (3) Extrato	IP (4) Óleo	ΔIP (5)
<i>Mirabilis jalapa</i>		B	3	35,0	27,2	71,4	7,8
<i>Lithraea molleoides</i>	Folhas e frutos	B	3	32,4	38,0	63,4	-5,6
<i>Callophyllum brasiliensis</i>	Folhas e galhos	B	3	35,0	83,9	71,4	-48,9
<i>Sapium biglandulosum</i>	Folhas	A	4	34,3	45,7	73,9	-11,4
	"	B	2	29,2	26,0	53,0	3,2
<i>Johannesia princeps</i>	Sementes	B	5	35,0	22,0	71,4	13,0

(1) $\Delta\%T$ = ver na tabela 2.

(2) IP BHT = índice de peróxido do óleo de soja com 5 mg de BHT

(3) IP EXTRATO = índice de peróxido do óleo de soja com 50 mg de extrato da planta

(4) IP ÓLEO = índice de peróxido do óleo puro de soja

(5) $\Delta IP = IP_{BHT} - IP_{Extrato}$.

Na Tabela 6 mostra-se o comportamento dos extratos no sistema lipídico, de acordo com sua forma de preparação (Figura 1), notando-se que a maior frequência antioxidante foi obtida com os extratos A, dado esse inverso ao obtido no teste no sistema modelo β -caroteno-ácido linoleico. Fazendo um resumo da atividade nos 2 sistemas, segundo as Tabelas 3 e 6, podemos dizer que os extratos A têm alta atividade no sistema lipídico e baixa no sistema aquoso; os extratos D mostram pouca atividade nos dois sistemas; os extratos B, C e E, atividade média e alta nos dois sistemas.

Os extratos, segundo sua polaridade, podem ser ordenados como segue: $A > B > E > C > D$.

Como se observa, é difícil de estabelecer alguma relação entre polaridade e atividade antioxidante, levando em conta que o poder antioxidante é o resultante de muitas propriedades do extrato, tais como solubilidade no sistema, presença de compostos com atividade sinergista, concentração, temperatura ótima.

SHERWIM (1978) opina que a máxima eficiência de um antioxidante é alcançada somente se ele é completamente misturado ou dissolvido no óleo ou gordura. Em nosso caso foi notado, das suas características muito polares, que os extratos não se solubilizavam totalmente no sistema, mesmo sendo previamente dissolvidos antes da adição. O critério acima descrito sobre a correlação entre eficiência antioxidante e solubilidade é contrário às observações deste trabalho, já que os extratos A que são os mais polares e portanto menos solúveis em óleo mostraram ser os de melhor atividade a antioxidante. A observação é válida também para os extratos D (menos polares) que não mostraram alta atividade neste sistema lipídico.

Na Tabela 7 mostra-se a capacidade antioxidante de algumas substâncias fenólicas, muitas das quais já estudadas como antioxidantes.

TABELA 6 - Comportamento dos extratos como antioxidantes, segundo a forma de preparação (*), no sistema lipídico (óleo de soja).

EXTRATO	Nº Extratos Testados	Nº de Extratos		Nº de Extratos	
		com $\Delta IP \geq 0$ (%)		com $\Delta IP > 10$ (%)	
A	7	4	(57,1)	3	(42,9)
B	19	6	(31,6)	2	(33,3)
C	9	4	(44,4)	3	(33,3)
D	2	0	(0,0)	0	(0,0)
E	5	2	(40,0)	1	(20,0)
TOTAL	42	16	(38,1)	9	(21,4)

(*) Vide Figura 1

TABELA 7 - Teste de capacidade antioxidante de algumas substâncias fenólicas (*) em óleo de soja 110°C x 3 hs, 20L/h ar.

Substâncias	IP subst (**)	IP óleo puro
BHT	14,4	30,3
BHA	14,4	30,3
Ascorbil palmitato (AP)	21,9	32,3
Propil galato (PG)	9,6	32,3
Ácido gálico	8,4	30,3
Ácido tânico	18,0	37,4
Ácido cafeico	13,7	36,1
Ácido hidrocafeico	14,4	36,1
Ácido ferúlico	34,3	33,5
Quercitina	17,1	30,3
Rutina	35,0	36,1
Miricetina	9,3	33,5
Apigenina	31,5	37,4
Naringina	35,0	36,1
Morina	20,3	33,5
Esculetina	13,1	37,4
Catequina	15,1	37,4

(*) O ascorbil palmitato (AP) embora não seja um composto fenólico foi incluído devido a sua reconhecida ação antioxidante.

(**) 5 mg da substância em 5 g de óleo de soja.

Neste sistema lipídico, algumas substâncias (rutina, naringina, apigenina e ác. ferúlico) têm pouca ou nenhuma atividade, enquanto que o ácido gálico, miricetina e propilgalato possuem as maiores atividades. Observa-se que algumas substâncias têm alta potência nos 2 sistemas estudados (Tabelas 4 e 7) tais como: BHT, BHA, PG, Ácido gálico, Ácido tânico, Ácido cafeico, Ácido hidrocafeico, quercitina, miricetina, esculetina e catequina. O ácido ferúlico e a naringenina têm pouca atividade nos dois sistemas. O ascorbil palmitato, apigenina e morina têm alta atividade no sistema aquoso e média atividade no lipídico. A rutina possui alta atividade no sistema aquoso e nenhuma num meio lipídico.

IKEHATA *et alii* (1968) encontraram que a 6,7,4'-tri-hidroxi isoflavona foi um potente antioxidante em soluções aquosas, mas que mostrou-se inefetiva em óleo de soja, explicando que provavelmente deve-se à insolubilidade do composto em óleo. Porém, PRATT & BIRAC (1979) indicam que certos flavonóides possuem atividade antioxidante quando suspensos em gorduras, fato que poderia explicar a atividade antioxidante dos extratos estudados, que mesmo insolúveis protegem o óleo.

Estudando a atividade de flavonóides como antioxidantes, HUDSON & MAHGOUB (1980) em óleo de soja a 100°C, encontraram que o BHT, BHA, PG e AP. possuem igual atividade, sendo esta maior que a da quercitina, enquanto os ácidos cafeico e ferúlico têm pouca atividade e a rutina nenhuma. Estes dados com exceção do ascorbil palmitato e ácido cafeico estão de acordo com os obtidos neste trabalho.

HUDSON e colaboradores (HUDSON & LEWIS 1983 a, b; DZIE-DZIC & HUDSON 1983 a,b) usaram um aparelho Rancimat para medição da capacidade antioxidante de flavonóides, porém seus resultados não

podem ser comparados com os obtidos neste trabalho, por terem usado banha a 100 e 140°C como substrato, além de vários sinergistas (fosfolipídios), já que a atividade depende em algum grau da composição dos ácidos graxos do sistema (LETAN 1966 a).

Mesmo sendo os resultados dos 2 testes independentes, na tabela 8 estão relacionados os 9 extratos que mostraram alta atividade antioxidante nos 2 sistemas e que foram escolhidos para tentar a separação dos compostos neles presentes (3a. Etapa).

TABELA 8 - Extratos que apresentaram alta atividade antioxidante nos dois sistemas testados (1a. e 2a. etapas).

PLANTA	EXTRATO	PARTE USADA	$\Delta\%T^{(*)}$	$\Delta IP^{(**)}$
<i>Piptadenia macrocarpa</i>	B	Folhas	3	23,4
<i>Cochlospermum insigne</i>	C	Raiz	5	20,6
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	A	Casca	5	18,4
<i>Mikania smilacina</i>	A	Folhas	4	17,2
<i>Piptadenia macrocarpa</i>	C	Raiz	3	15,3
<i>Solanum viarum</i>	A	Folhas e galhos	4,5	14,7
<i>Johannesia princeps</i>	B	Sementes	5	13,0
<i>Vernonia diffusa</i>	C	Folhas e galhos	5	11,0
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	E	Folhas	2	10,4

(*) $\Delta\%T = \% T_{\text{tempo } 105\text{min}} - \% T_{\text{tempo zero}}$ (sistema β -caroteno-ácido linoleico).

(**) $\Delta IP = IP_{\text{BHT}} - IP_{\text{Extrato}}$ (sistema lipídico, óleo de soja).

Isolamento e purificação (3a. etapa)

e

Identificação (4a. etapa)

Para facilitar a interpretação dos resultados obtidos nestas duas etapas, eles são apresentados e discutidos em forma conjunta.

Cromatografia em camada delgada (CCD-preliminar)

A cromatografia em sílica gel, celulose e poliamida dos 8 extratos originais (o extrato C de folhas de *Vernonia diffusa* não foi analisado por não se dispor de suficiente amostra) não forneceu uma boa separação dos compostos presentes, obtendo-se quase sempre placas com muita cauda e sem nenhuma resolução. Em geral os melhores resultados foram obtidos com sistemas eluentes muito polares, tais como: clorofórmio: acetato de etila: ác. fórmico (5:4:1) e éter de petróleo: benzeno: ác. acético (3:4:3). A separação por CCD-preparativa com estes sistemas foi tentada, porém sem resultados na identificação devido às dificuldades encontradas na eliminação dos ácidos usados e pela grande afinidade dos extratos pelo adsorvente, o que impediu uma recuperação adequada com metanol. MARKHAM (1975) explica que, em geral, os flavonóides são retidos fortemente em placas de celulose, sílica ou poliamida, requerendo solventes de alta polaridade para sua eluição.

Nos extratos hidrolizados de *Cochlospermum insignis* (C), *Solanum viarum* (A) e *Mikania smilacina* (A) foi possível a separa-

ção de alguns componentes menos polares com placas de sílica gel usando misturas de hexano: acetato de etila. Junto com a amostra foram aplicados flavonóides puros (Tabela 4), mas nenhum deles estava presente no extrato, já que mostraram R_fs e espectros UV diferentes. Estes componentes menos polares provavelmente seriam isoflavonas, flavanonas ou di-hidroflavonóis (MARHAM, 1975). GUGOLZ *et alii* (1961) separaram isoflavonas com CCD em sílica, usando hexano: acetato de etila (3:1 e 1:1).

Avaliação de Taninos

O conteúdo de taninos (%), mostrado na Tabela 9, foi calculado de acordo com a curva padrão de catequina (Fig. 6). Observa-se que os extratos de *Mikania smilacina*, *Solanum viarum* e *Johannesia princeps* não contêm taninos, enquanto que *Cochlospermum insignis* contém pouca quantidade. Estes extratos possuem outros fenóis, já que o teste de $\text{FeCl}_3 + \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ para detectar estes compostos é positivo, provavelmente contêm compostos fenólicos mais simples que taninos. Este resultado parece estar relacionado diretamente com o comportamento cromatográfico dos extratos hidrolizados, já que os que possuem altas concentrações de taninos são muito difíceis de trabalhar seja com sílica, celulose ou poliamida.

O método de avaliação usado neste trabalho, quantifica os taninos condensados (BURNS, 1971), que segundo HASLAM (1966) a sua separação cromatográfica em papel é muito mais difícil do que para taninos hidrolizáveis.

TABELA 9 - Avaliação do teor de taninos nos extratos selecionados para análise.

PLANTA	EXTRATO	PARTE USADA	% TANINOS*
<i>Johannesia princeps</i>	B	Sementes	0,0
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	A	Casca	24,7
" " " "	E	Folhas	28,6
<i>Piptadenia macrocarpa</i>	C	Raiz	20,1
" " "	B	Folhas	19,3
<i>Mikania smilacina</i>	A	Folhas	0,0
<i>Solanum viarum</i>	A	Folhas e galhos	0,0
<i>Cochlospermum insignne</i>	C	Raiz	2,5

* % TANINOS = $0.42 \times \% \text{ CATEQUINA}$. (PRICE *et alii*, 1978).

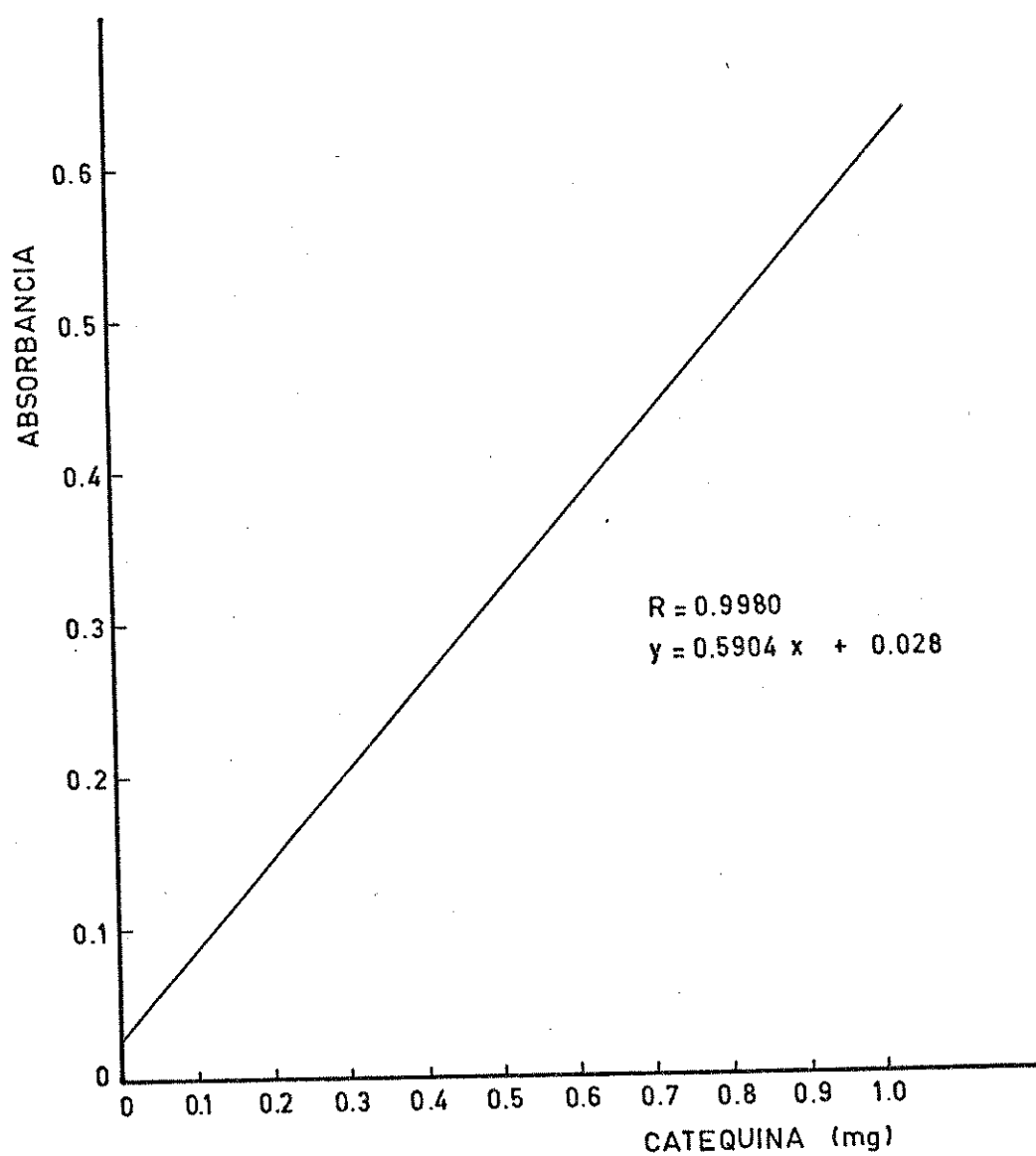


FIGURA 6 - Curva padrão para o cálculo do teor de taninos nos extratos.

$$\text{Taninos} = \text{catequina} \times 0,42$$

Cochlospermum insigne

Sobre esta espécie não foi encontrada nenhuma informação fitoquímica no Chemical Abstracts. Porém, neste gênero já foram identificados alguns flavonóides como: apigenina, naringenina, afzelechina em *C. gillivraei* (COOK & KNOX, 1975); quercitina, kampfrol e miricetina em *C. religiosum* (BATE-SMITH, 1964). Além de açúcares ácidos em *C. gossypium* (ASPINALL *et alii*, 1965); carotenóides e uma quinona em *C. angolense* (NOGUEIRA, 1956).

Neste trabalho foram hidrolizados 14,67 g do extrato C, obtendo-se 4,85 g de amostra, a qual foi separada por CLAE em uma coluna de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano: acetato de etila (4:6), tirando 15 frações, as quais foram examinadas por CCD em sílica no mesmo solvente (ver Figura 7). Observando-se que as frações 2, 3 ($R_f=0,78$) e 7 são compostos aparentemente puros, enquanto que as demais são misturas. Procedendo-se então, a uma nova CLAE-preparativa das frações 5 e 6, nas mesmas condições. Foram coletadas 10 novas frações (ver Figura 8), das quais a 7', 8' e 9' ($R_f=0,54$), parecem ser compostos puros e ser o mesmo composto da fração 7 na primeira CLAE-preparativa.

Nenhum dos flavonóides puros disponíveis (Tabela 4) apresenta R_f s similares aos encontrados para as frações acima descritas.

FRAÇÃO 3.

O espectro ultravioleta desta fração em metanol (Figura 9) apresentou absorbância máxima em 314 (ombro) e 280 nm.

A partir da comparação deste espectro com os publicados para flavonóides (MABRY *et alii*, 1970) observou-se que este padrão

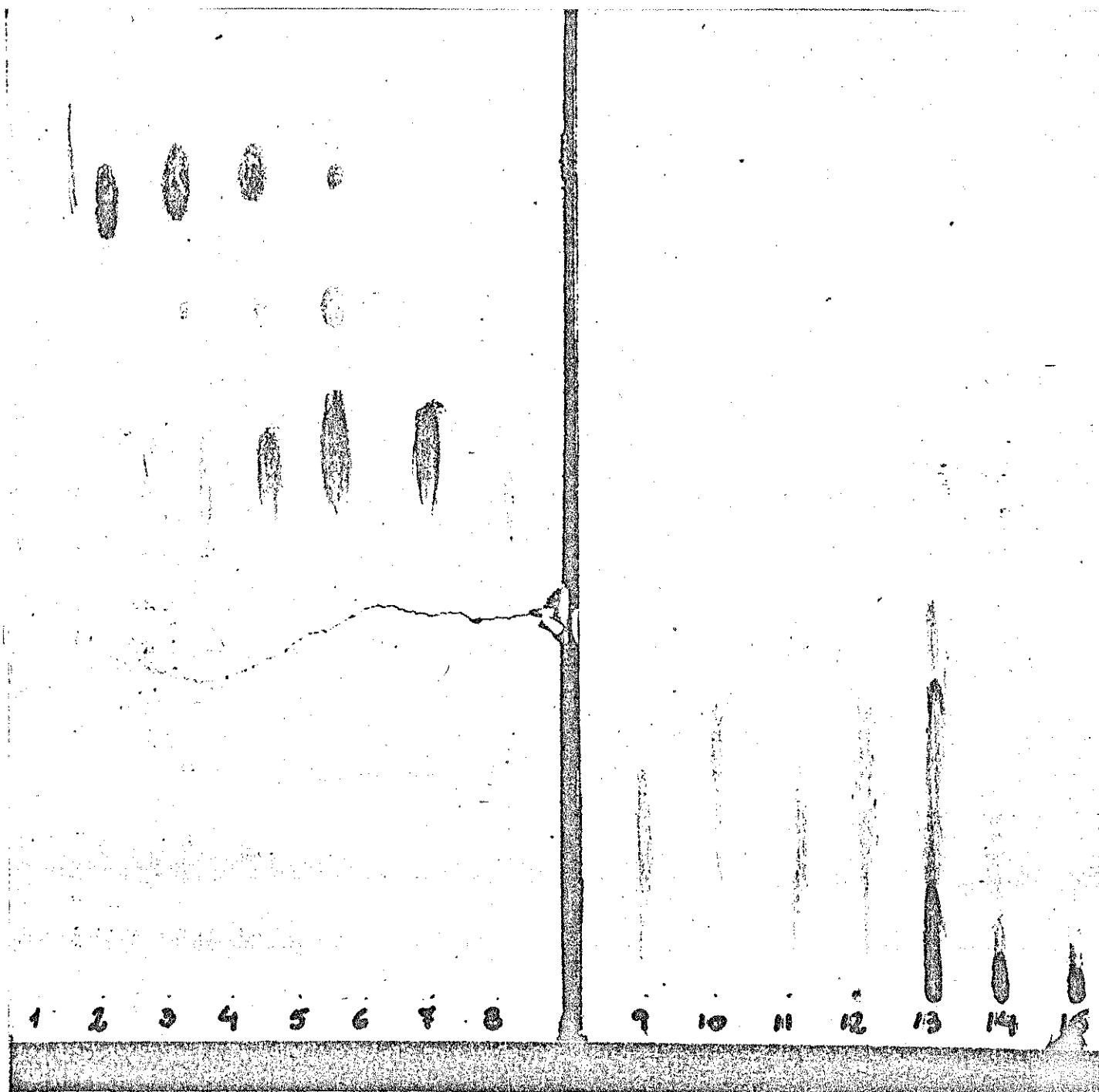


FIGURA 7 - Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel das frações obtidas na CLAE do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignis*.

Solvente hexano: acetato de etila (4:6)

Revelador H_2SO_4 :MeOH (1:1)

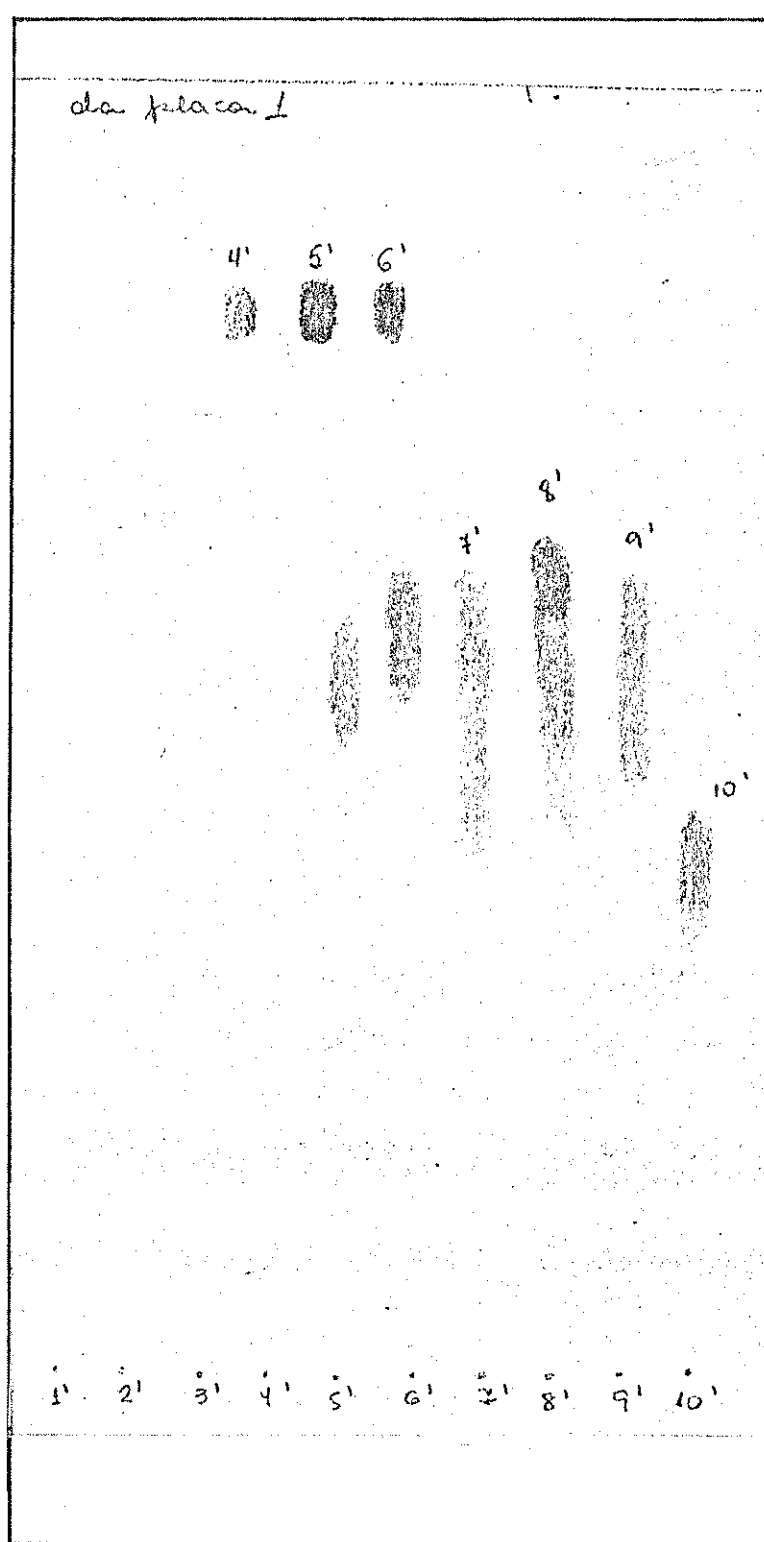


FIGURA 8 - Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel das frações obtidas por CLAE das frações 5 e 6 do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignne*. Solvente hexano: acetato (4:6) Revelador $H_2SO_4/MeOH$ (1:1)

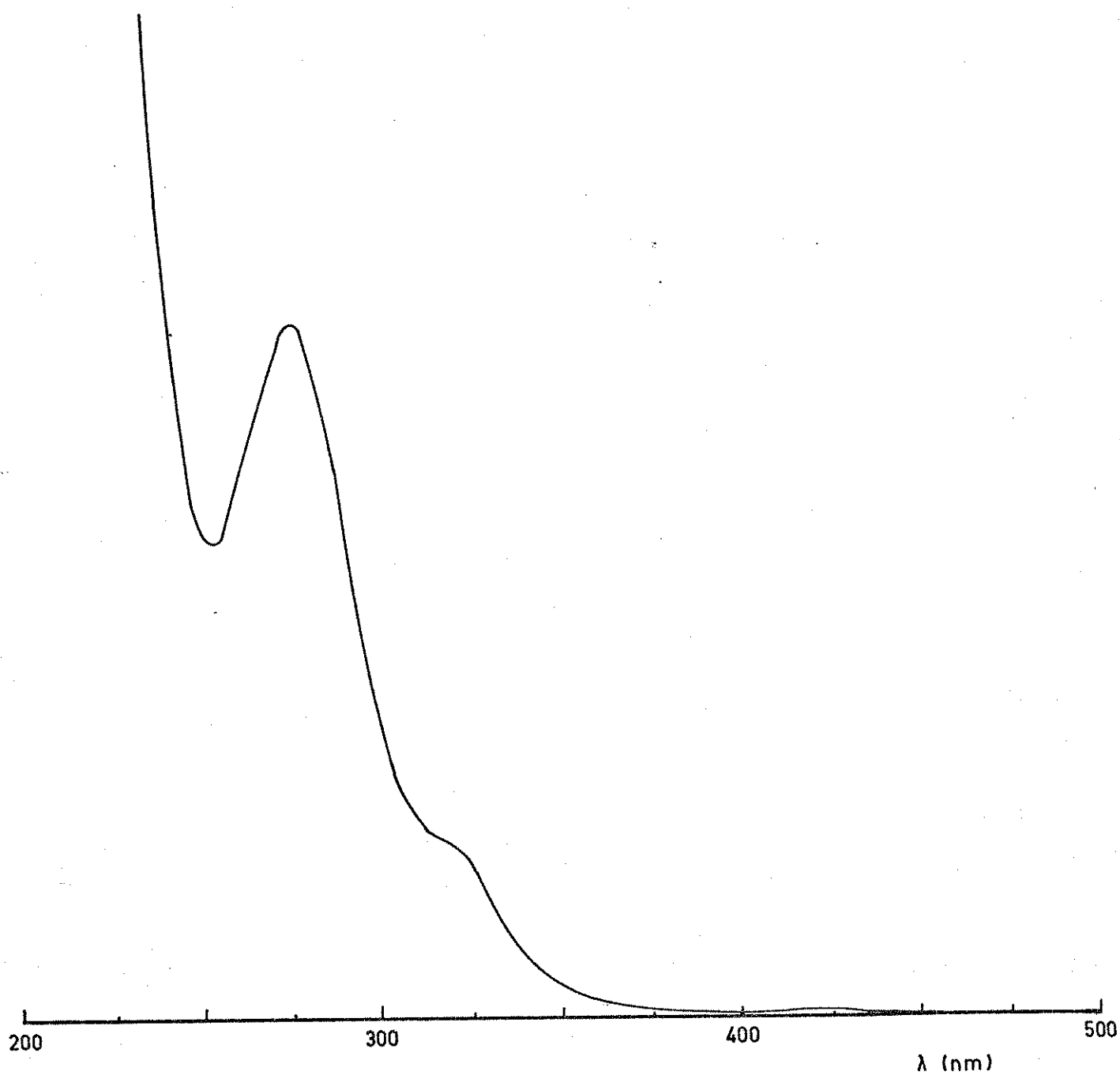


FIGURA 9 - Espectro Ultravioleta (UV) em metanol da fração 3 (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignis*.

de absorção estava coerente para flavanonas, isoflavonas e di-hidroflavonóis, que possuem somente um máximo de absorção (anel A).

A CG-EM (Figura 10) revelou que a fração era uma mistura onde o componente predominante apresentava M^+ m/e de 302 uma, cujo fragmento M-15 indicava a provável presença de um grupamento metoxila (OCH_3).

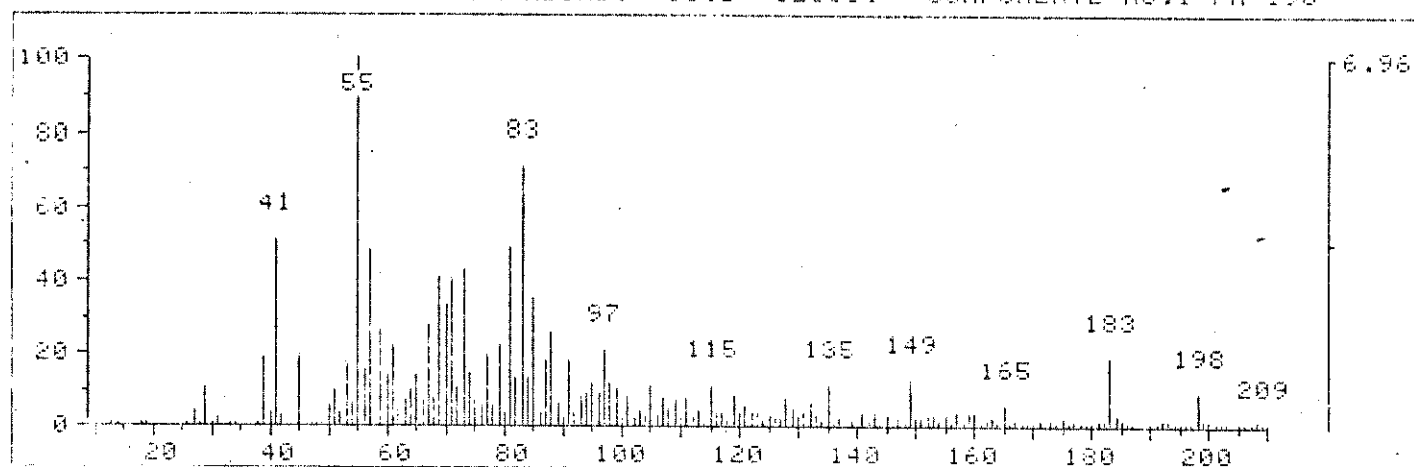
A análise do espectro de RMN'H da fração em deutero metanol (Figura 11) apresentou um multipeto em $\delta = 5,95$ semelhante ao observado para flavonóides com padrão de substituição do anel A nas posições 5 e 7.

Na região de $\delta = 6,75 - 7,30$ observamos sinais que poderiam sugerir um padrão de substituição do anel B, entretanto não tendo obtido um bom padrão para comparação, deixamos em suspenso, determinando somente que o anel B deverá apresentar um grupo fenólico com um grupo metoxila e um hidroxila, os quais não estão em posição 3' e 4' (orto). O grupo metoxila fica evidenciado também pelo sinal em $\delta = 3,95$.

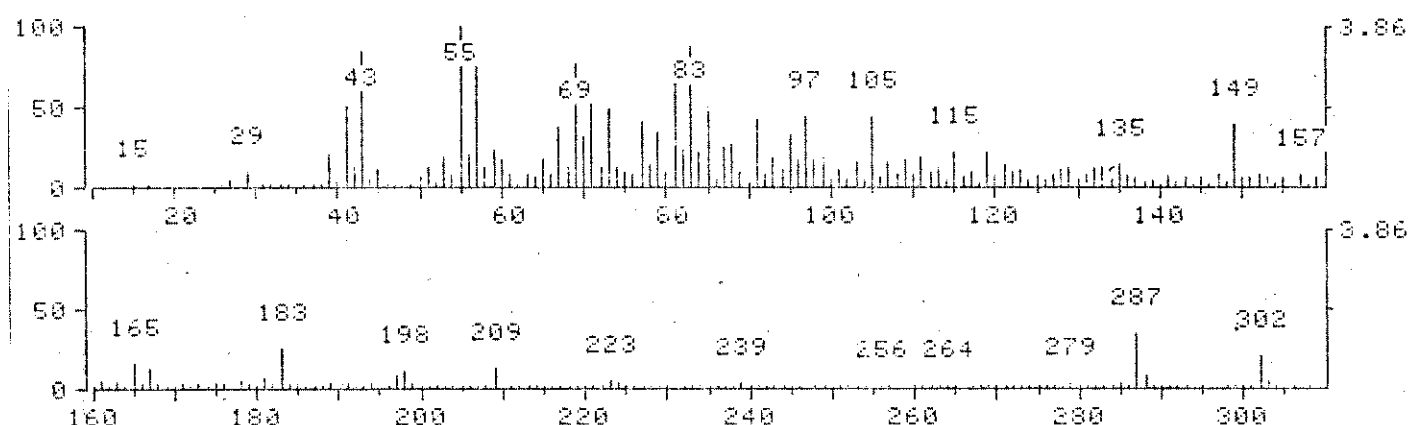
FRAÇÃO 8'

O espectro UV em metanol apresenta máximo de absorbância (λ máx.) em 290 e 330 (ombro). Os espectros dos derivados com NaOMe, AlCl_3 , AlCl_3/HCl , NaOAC e NaOAC/ H_3BO_3 são apresentados nas Figuras 12, 13 e 14; seus máximos estão na Tabela 10.

AVERAGED SPECTRUM * BASE PK/ABUND: 55.2/ 32000. COMPONENTE NO.1 PM 198



* 28 RET. TIME: 3.66 TOT ABUND= 51224. COMPONENTE NO. 2



AVERAGED SPECTRUM * BASE PK/ABUND: 105.2/ 32000. COMPONENTE NO. 3

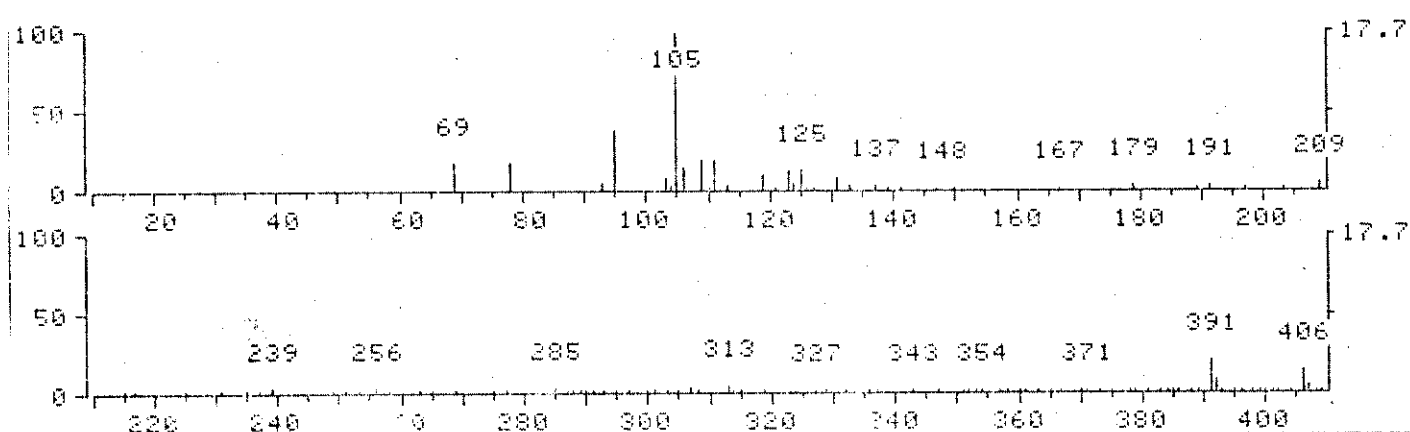


FIGURA 10 - Espectro de Massa (EM) da fração 3 (CLAE) do extrato
(C) hidrolizado de *Cochlospermum insigne*.

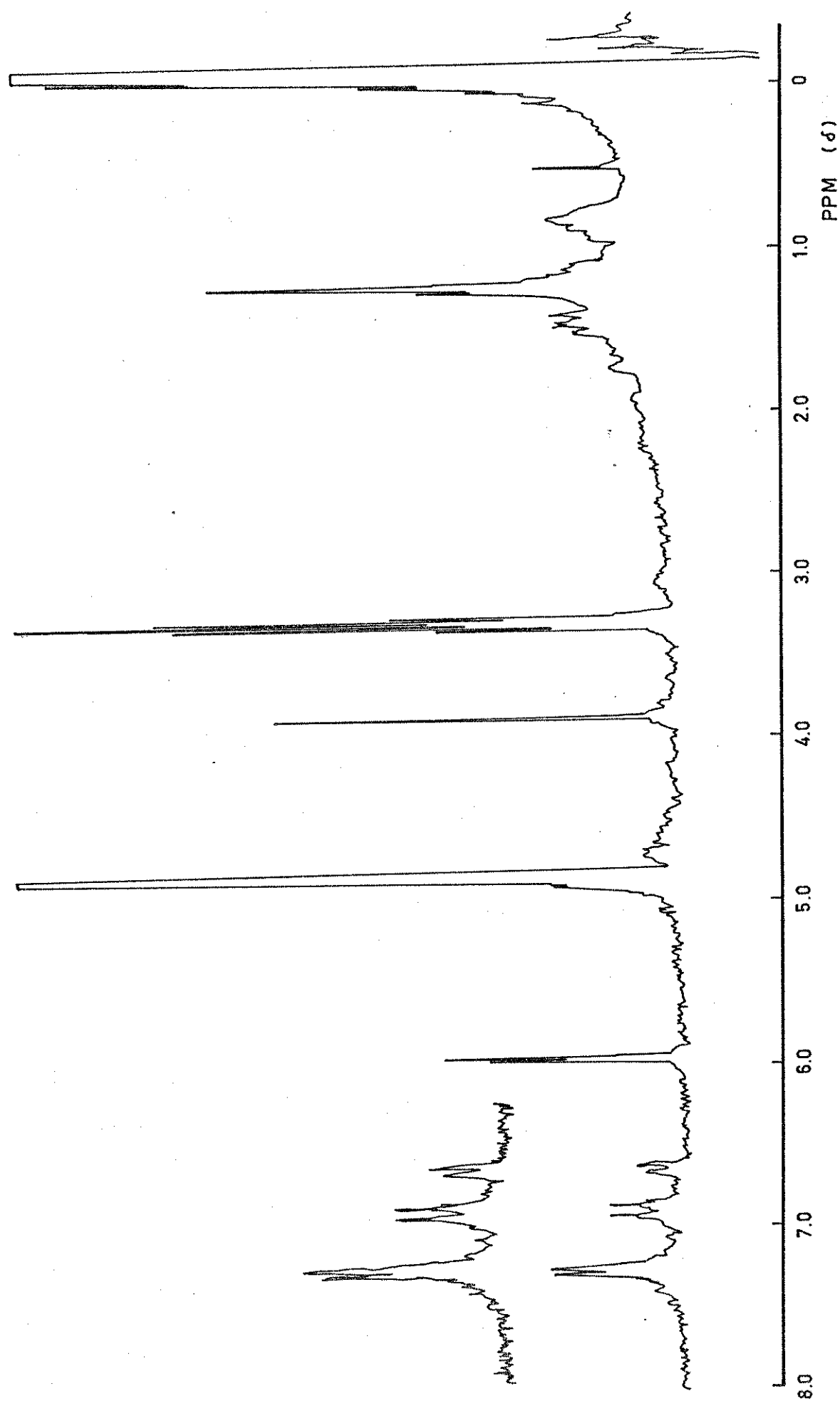


FIGURA 11 - Espectro RMN ^1H da fração 3 (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignne* em deuterometanol (CD_3OD).

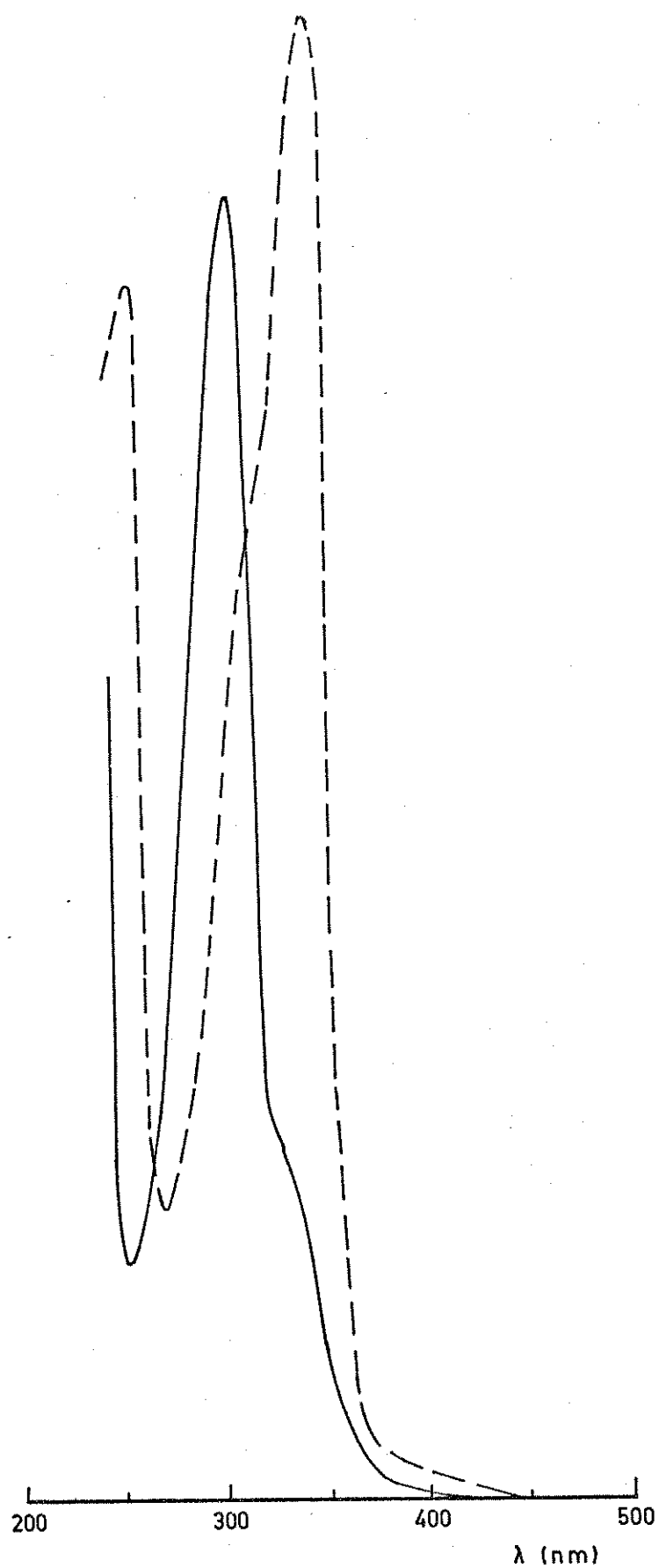


FIGURA 12 - Espectro ultravioleta (UV) da fração 8' (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignis*, em metanol (—); com metóxido de sódio (— —).

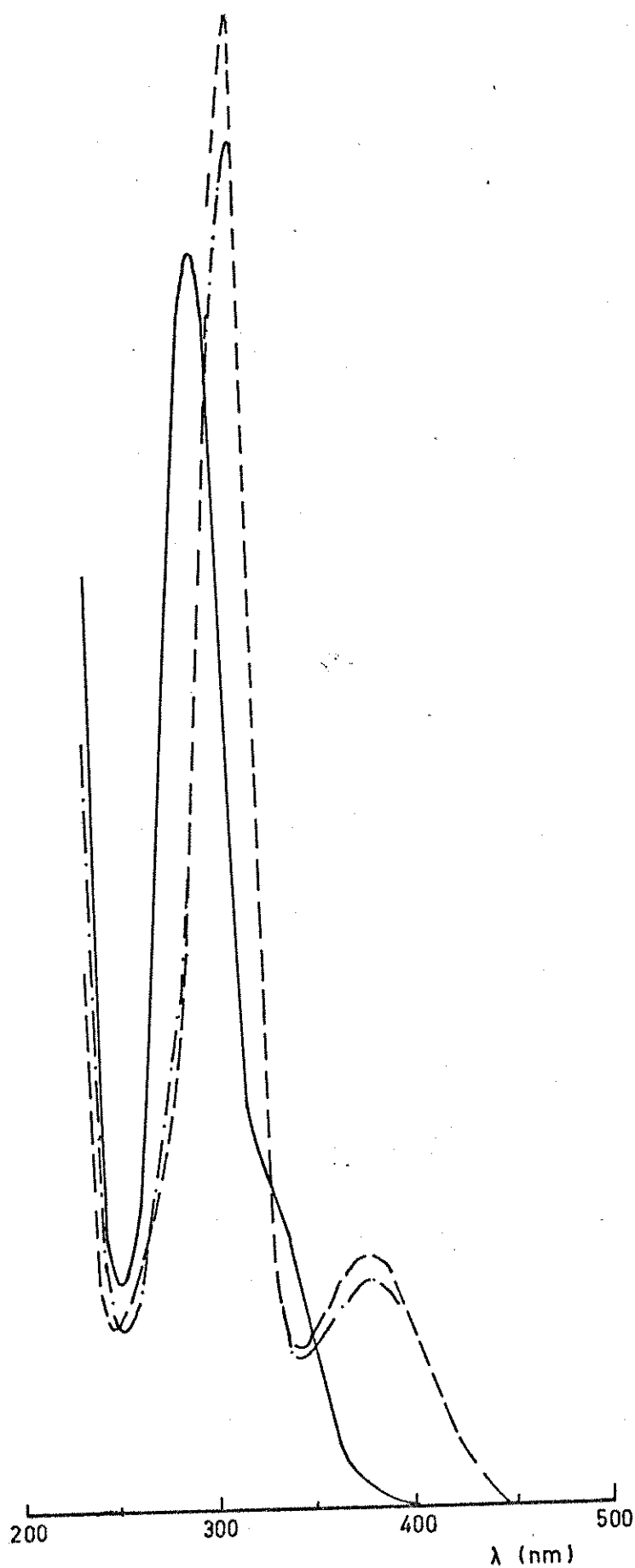


FIGURA 13 - Espectro ultravioleta (UV) da fração 8' (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignis*, em metanol (—); com AlCl_3 (— —); com AlCl_3/HCl (— . —).

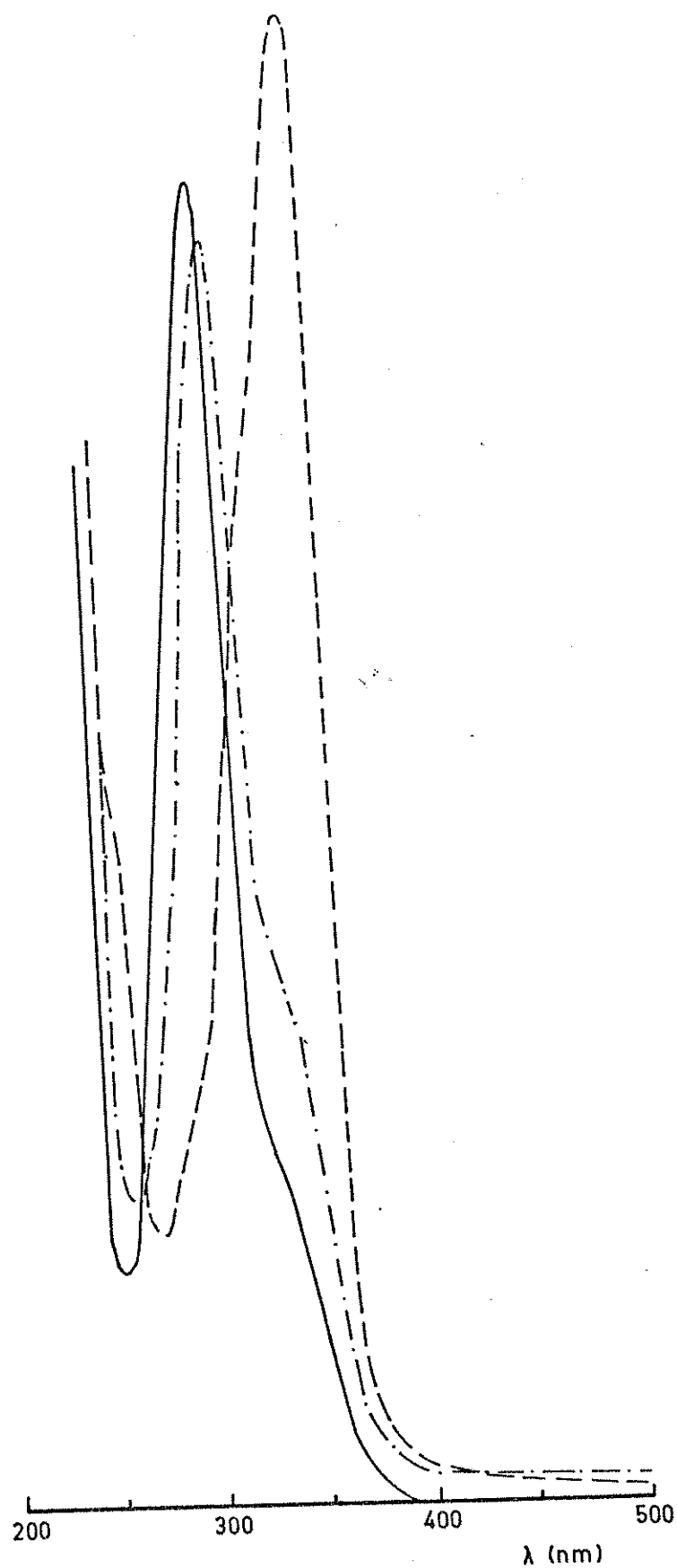
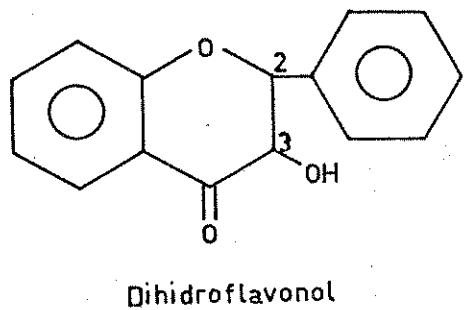
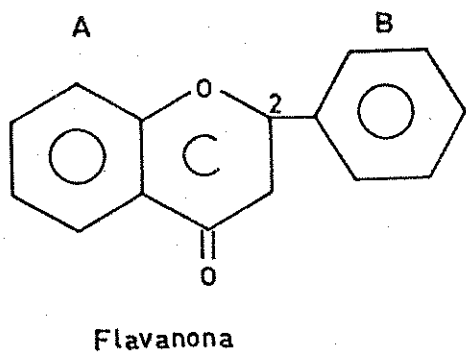


FIGURA 14 - Espectro ultravioleta (UV) da fração 8' (CLAE) do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insigne*, em metanol (—); com acetado de sódio (— —); com acetato de sôdio/ácido bórico (—.—).

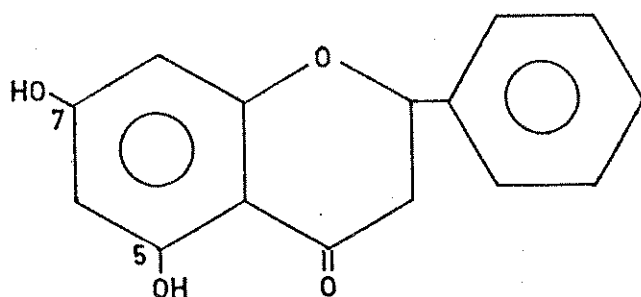
TABELA 10. Máximos de absorbância (λ máx.) da fração 8' do extra-
to (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignae*.

Reagente	λ (máx.) nm.
MeOH.....	290,330(o)
MeONa.....	245,326
MeONA (5 min).....	243,326
AlCl ₃	272(o), 315, 381
AlCl ₃ /HCl.....	315, 379
NaOAC.....	258, 284(o), 327
NaOAC/H ₃ BO ₃	294, 334(o)

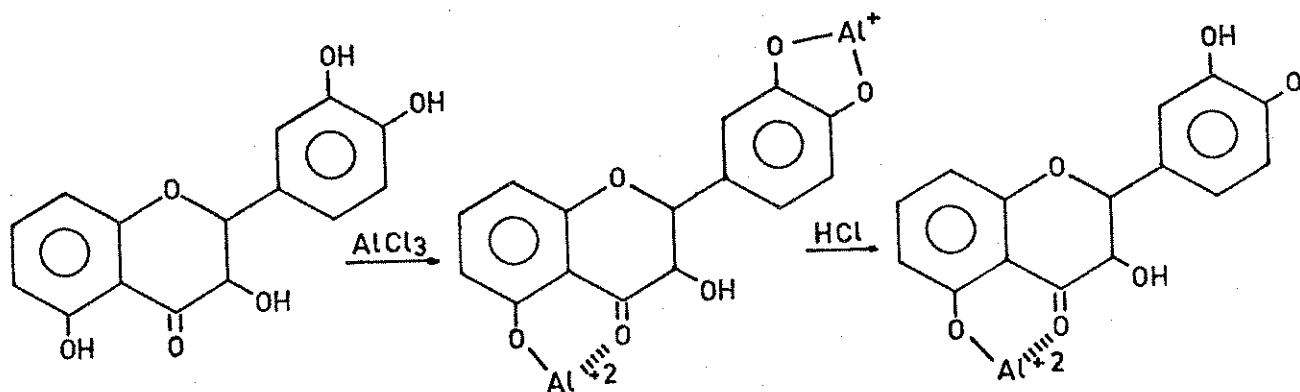
Pelo espectro de UV em metanol (Figura 12), o compos-
to presente nesta fração (8') deve tratar-se de uma flavanona ou
um di-hidroflavonol (3-OH), cuja banda II situa-se entre 270 e 295
nm (MABRY *et alii*, 1970). Nestes compostos a banda I não está
presente, por causa da interrupção do sistema coordenado na posi-
ção 2.



No espectro com metóxido de sódio (Figura 12), obser-
va-se um efeito batocrômico de 38 nm, com um aumento da intensidade,
característico da presença de grupamentos hidroxilas, nas posições 5 e 7 (MA-
BRY *et alii*, 1970).



Nesta fração não é observada a decomposição com o metóxido, após 5 minutos de sua adição. No espectro com acetato de sódio (Figura 14) é observado um efeito batocrômico de 37 nm, o qual desaparece com a adição de ácido bórico. Este efeito comprova a presença de grupamentos 5 e 7 hidroxilas. O espectro ultravioleta com tricloreto de alumínio (Figura 13) apresenta um efeito batocrômico de 22 nm, característico de di-hidroflavonóis com grupamento 5-OH e ausência de grupos o-di-hidroxi no anel B (MABRY *et alii*, 1970), já que não é reversível ao adicionar HCl.



No espectro de RMN¹H do composto em deutero metanol (Figura 15) pode-se observar dois dubletes em $\delta = 7,00$ e $\delta = 7,60$ com constante de acoplamento de $J = 9,5$ Hz, característico para acoplamentos orto em sistemas aromáticos.

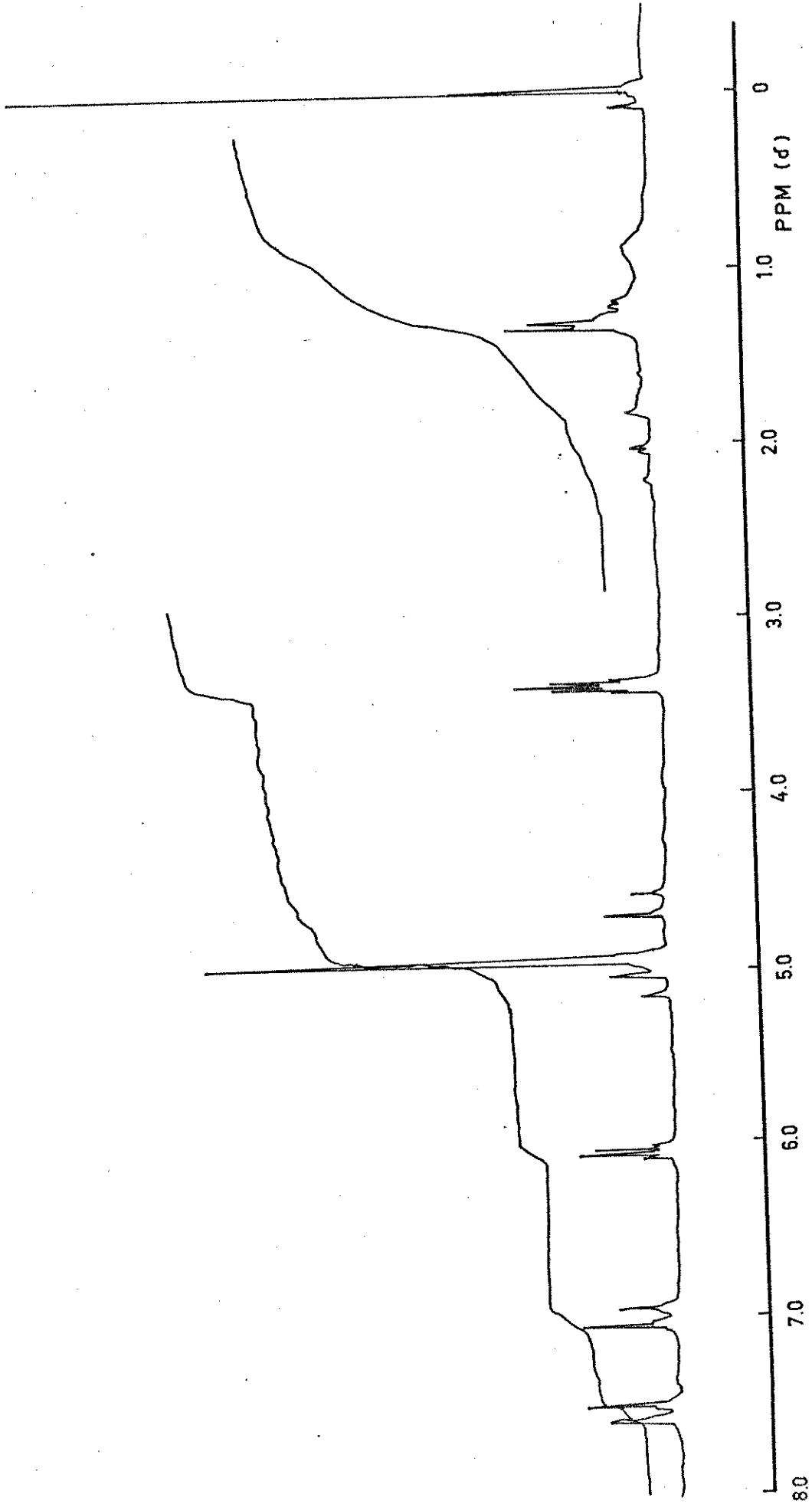
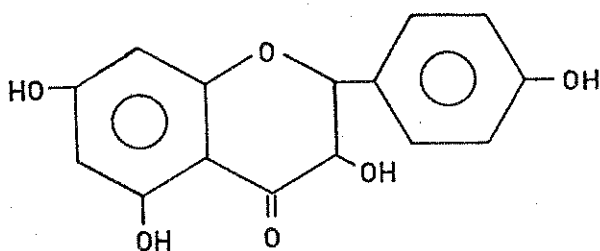


FIGURA 15 - Espectro RMN¹H da fração 8' (CLAE) do extrato hidrolizado (C) de *Cochiperum* insigne em deuterometanol (CD₃OD).

Levando em consideração que o espectro de ultravioleta estava coerente com um esqueleto básico de uma flavanona ou di-hidroflavonol, é observado o sistema de dois dubletes em $\delta = 4,60$ e $\delta = 5,10$ com $J = 12$ Hz, podemos sugerir que este sistema de prótons se trata do sistema A comumente observado pelo acoplamento de H2 e H3 em di-hidroflavonóis.

O multiplete em $\delta = 6,0$ estaria de acordo com a absorção de prótons aromáticos H6 e H8 de di-hidroflavonóis.

Desta forma reunindo as informações obtidas pela análise dos espectros de ultravioleta e RMN'H poderíamos sugerir a estrutura seguinte:



para o composto isolado do extrato C de raiz de *Cochlospermum insignne*.

O espectro de massa (Figura 16) apresentou um íon molecular M^+ m/e 288 uma, cuja fragmentação está coerente com a estrutura proposta e está indicada na Figura 17.

A revisão da literatura indicou que a estrutura proposta estava de acordo com a do di-hidrocampferol (MABRY *et alii* 1970).

Para uma comparação estrutural fôï preparado o derivado silanizado do composto obtendo-se o espectro de RMN'H ($CDCl_3$) ($SiMe_4$) 4,24 (1H, d, $J=12$ Hz, H-3); 4,98 (1H, d, $J=12$ Hz, H-2); 5,90 (2H, dl, H-6, H-8); 6,82 (2H, $J=9,5$ Hz, H-3', H-5'); 7,34 (2H, $J=9,5$ Hz, H-2', H-6'), mostrado na Figura 18.

SOLIDO 8'
ENTRADA SOLIDOS

6837

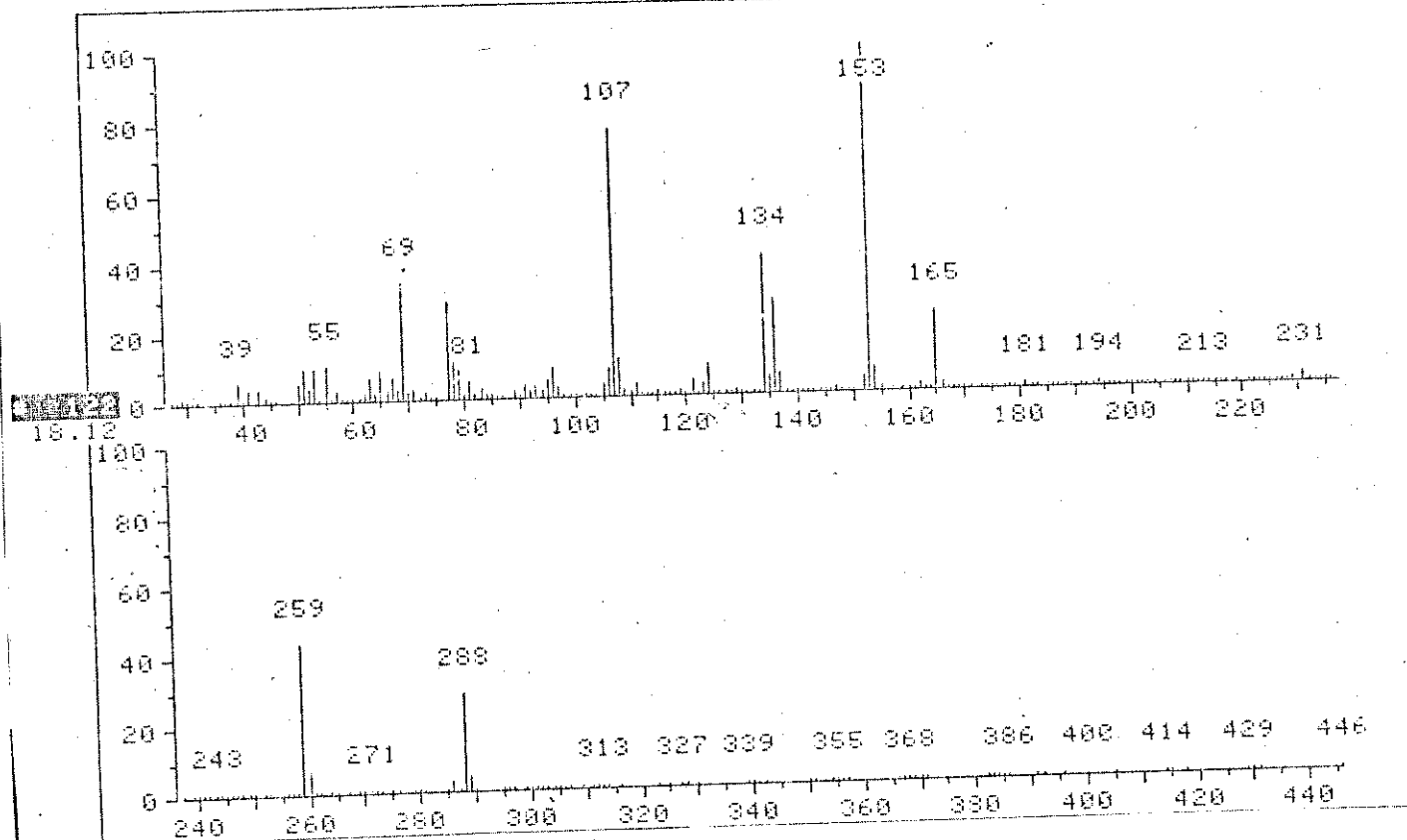


FIGURA 16 - Espectro de massa (EM) da fração 8' (CLAE) do extrato
(C) hidrolizado de *Cochlospermum insignis*.

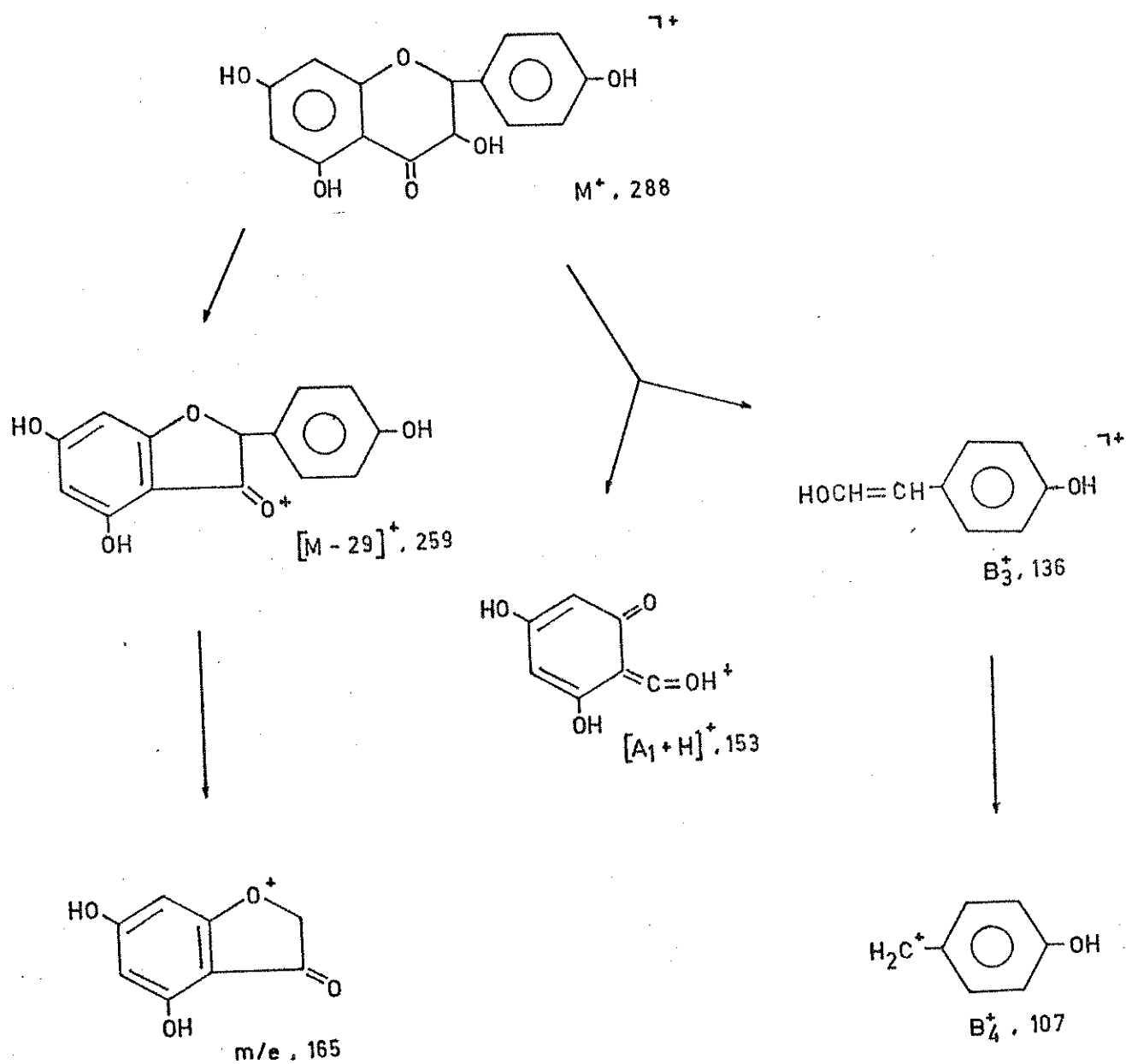


FIGURA 17 - Padrão de fragmentação do di-hidro-kampferol, baseado em MABRY & MARKHAM (1975).

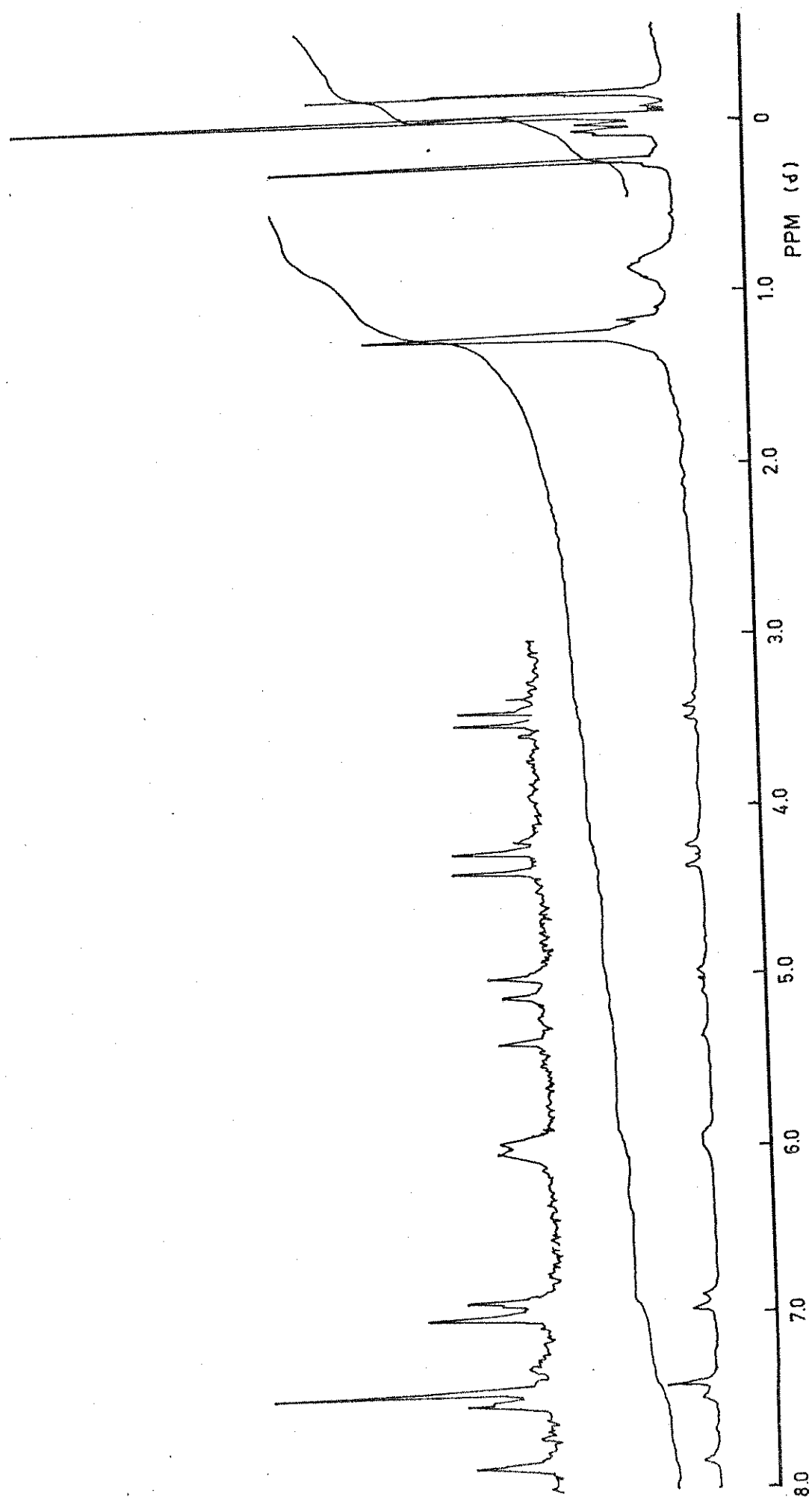


FIGURA 18 - Espectro RMN ^1H da fração 8' (CLAE) silânizada do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignis* em deuterochloroformio (CDCl_3).

A comparação destes dados com a literatura (MABRY *et alii*, 1970; BATTERHAM & HIGHET, 1964) forneceu uma concordância entre todas as absorções ficando assim confirmada a estrutura proposta.

O ponto de fusão para o di-hidrocampferol isolado foi 235-237°C, a rotação óptica $[\alpha]_D^{20} = + 20,26^\circ$ (C. 0.08, MeOH).

Na literatura são reportados para esta substância: 246-247°C (GANGULY & SESHADRY, 1961); 244-246°C e $[\alpha]_D^{20} = + 51,5^\circ$, solução em acetona: água 1:1 (HILLIS & CARLE, 1963); 233°C para di-hidrocampferol bruto e 241-242°C para recristalizado várias vezes (JANES & MORGAN, 1960); 222-224°C, $[\alpha]_D^{20} = + 2,5^\circ$ solução 1% em Et-OH e $+ 9^\circ$ em acetona: água, 1:1 (KING *et alii*, 1955); $[\alpha]_D^{20} = + 13^\circ$, solução 4% em Et-OH (PEW, 1948); 248°C, $[\alpha]_D^{20} = + 50^\circ$ em Me-OH 50% (DEAN, 1963).

O rendimento obtido foi de 0,9% (135 mg nas frações 7', 8' e 9'). O di-hidrocampferol (3, 4', 5, 7-tetra-hidroxi flavona) conhecido como aromadendrina ou katsurenina (BATE-SMITH, 1954) é um dos di-hidroflavonóis mais amplamente distribuídos e pode ser encontrado na sua forma de fenol livre (aglicona) ou como glicosídeo, num grande número de famílias vegetais (BOHM, 1975).

Baseado na revisão do Chemical Abstracts, na família Cochlospermaceae à qual pertence a planta *Cochlospermum insigne* o di-hidrocampferol não foi anteriormente isolado.

Uma nova tentativa, para isolar o composto mais polar presente no extrato (ver Figura 8, fração 10') já que ele apresentava alta capacidade antioxidante (Tabela 11, fração 8), foi feita com CLAE-preparativa, usando como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila (3:7), obtendo-se 13 frações nas frações 7, 8 e 9, as quais foram submetidas a uma nova CLAE-preparativa, observando-se que a fração 8 encontra-se aparentemente pura.

O espectro UV desta fração mostra absorção máxima em 272 nm (Figura 19). O espectro de massa desta fração mostrou tratar-se de uma mistura complexa, motivo pelo qual foi feita uma cromatografia de gás-espectrometria de massa (CG-EM), observando-se que a referida fração continha pelo menos 18 componentes (Figura 20).

Na Figura 21 mostra-se o espectro de massa dos principais componentes da fração (8), cujos pesos moleculares (PM) e tempos de retenção (TR) são os seguintes:

componente	4	-	PM = 198 uma,	TR = 11,72 min
"	15	-	PM = 302 uma,	TR = 25,38 min
"	16	-	PM = 302 uma,	TR = 25,93 min
"	17	-	PM = 302 uma,	TR = 28,30 min

Os componentes 15, 16 e 17 (Figura 21) têm o mesmo peso molecular (302 uma), tratando-se portanto, de isômeros. Estes três componentes têm em seu primeiro fragmento principal 287 uma, uma diferença de 15 unidades, caracterizando a fragmentação de um grupamento metila (CH_3), indicando que estes compostos poderiam ser flavonóides de fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (DEWAR & JONES, 1969), possuindo um grupamento metoxila (OCH_3).

A separação em coluna (2,4 x 20 cm) de celulose (16 g) deste extrato hidrolizado, também foi tentada com misturas de hexano: acetato de etila, e com acetato de etila: metanol, em diferentes proporções (gradiente).

Com o uso destes 2 sistemas de eluição foi coberta quase toda a escala de polaridade com respeito ao eluente, mesmo assim nenhuma das frações (30 em cada caso) continha um só componente.

Apesar de todas as tentativas para isolar algum outro composto presente, no extrato (C) de *Cochlospermum insignis*, só foi identificado o di-hidrocampferol.

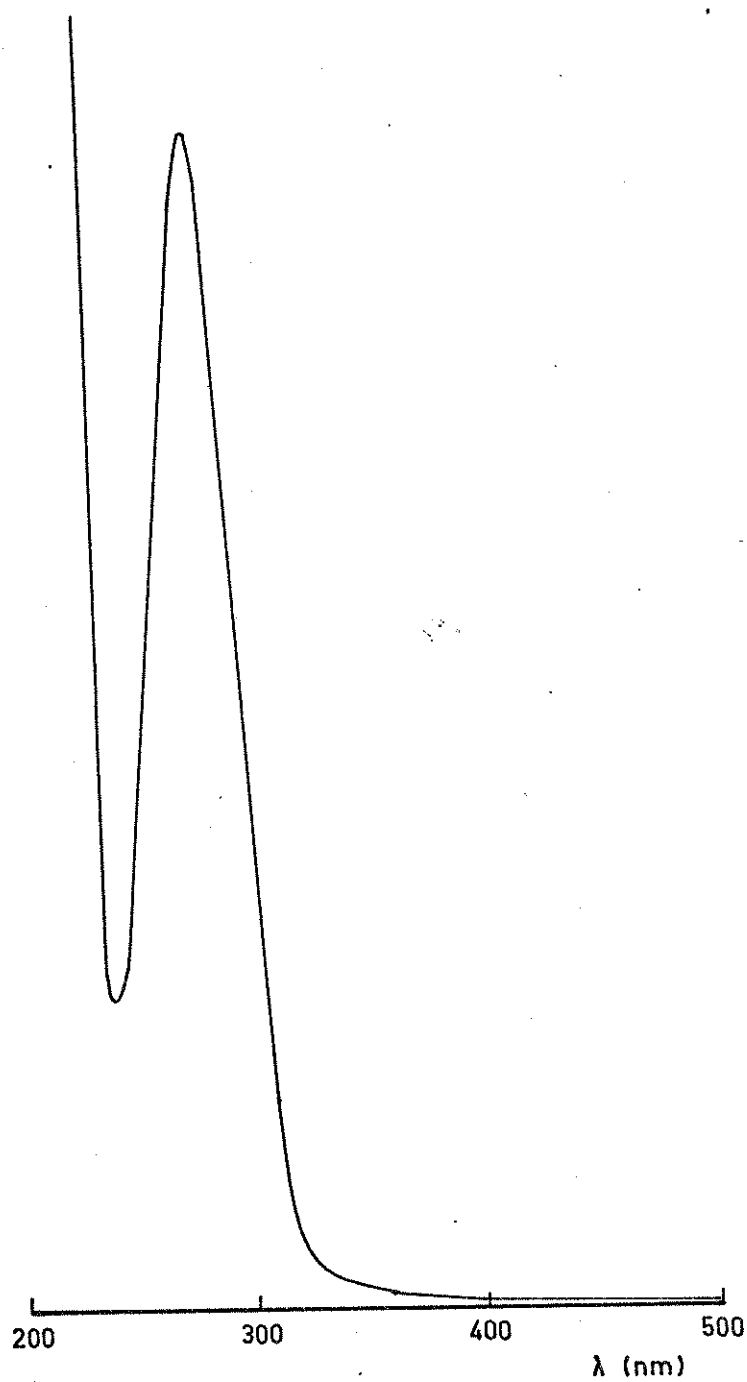


FIGURA 19 - Espectro Ultravioleta (UV) da fração 8 (CLAE - segunda tentativa) do extrato (C) hidrolizado de *Cochlospermum insigne* em metanol.

143-H (7+6+9) FRACAO PREP. 8
 3E-30 5%, 1.0M, GAS ARRASTE HELIO (40ML/MIN), TEMP. INJ. 250C
 PROGRAMACAO: 100C(9 MIN) - 5 C/MIN - 230C

6573

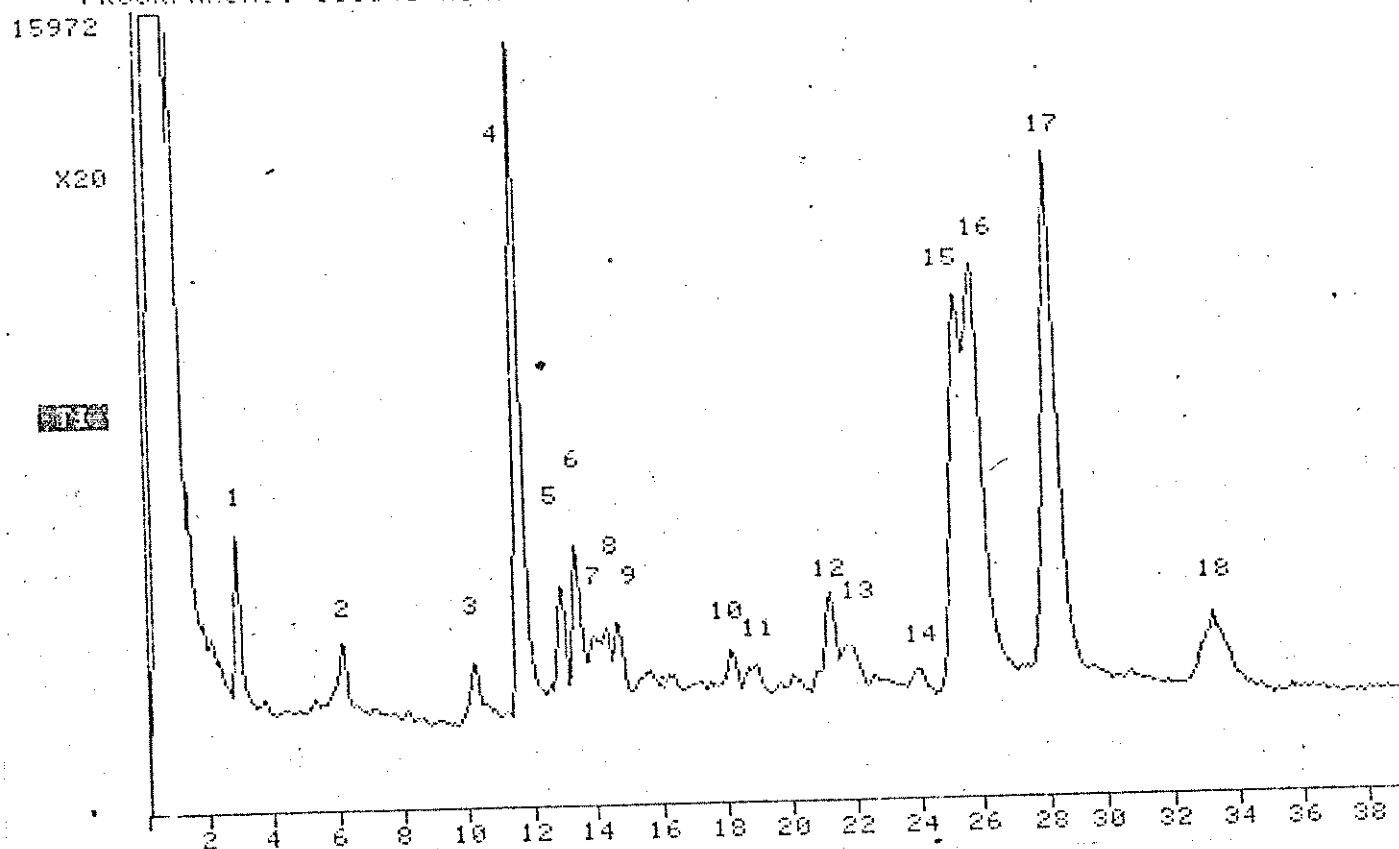


FIGURA 20 - Cromatografia gasosa da fração 8 (CLAE) do extrato
 (C) hidrolizado de *Cochlospermum insignis*.
 Coluna SE-30 5%.

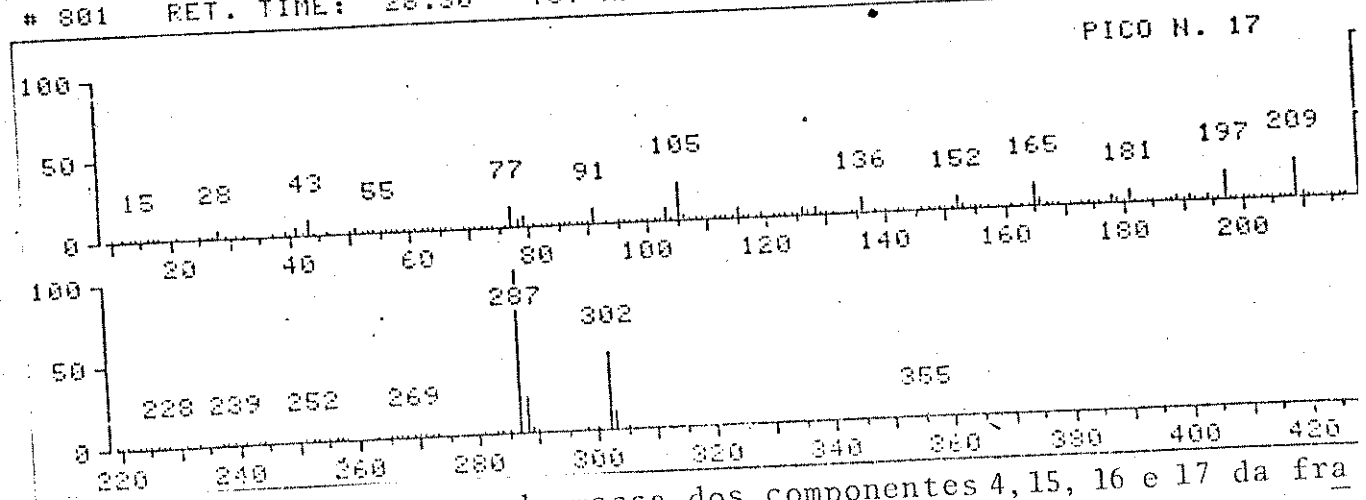
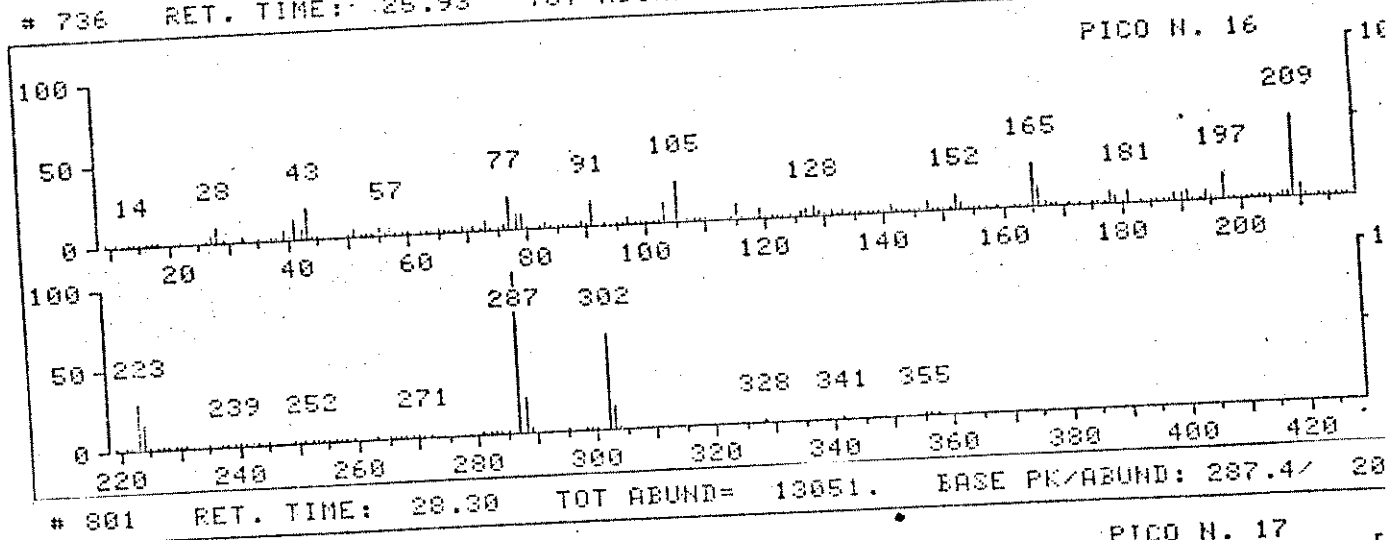
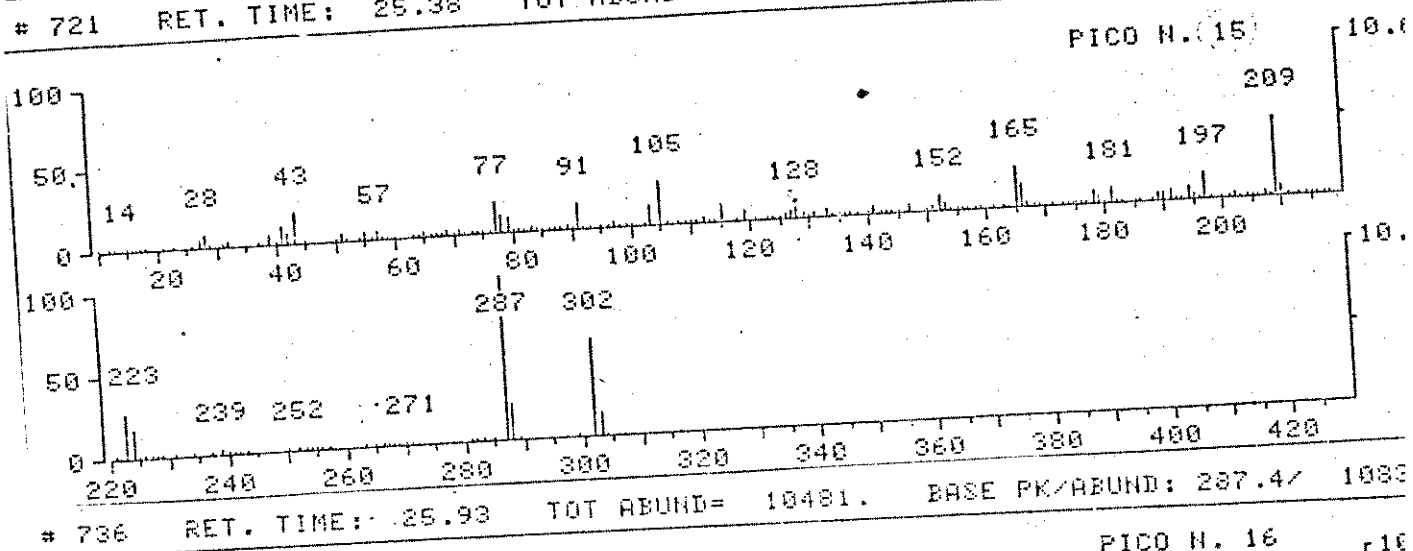
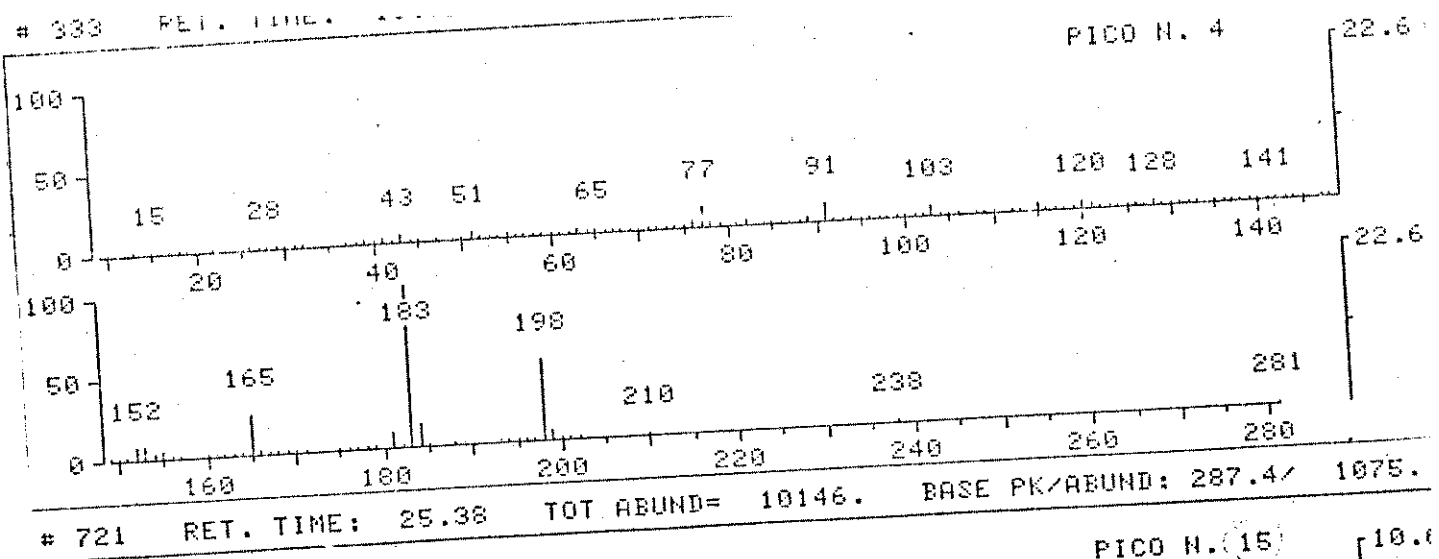


FIGURA 21 - Espectro de massa dos componentes 4, 15, 16 e 17 da fração 8 da CLAE-preparativa das frações (7+8+9) do extrato hidrolizado (C) de *Cochlospermum insignis*.

Solanum viarum

Nesta planta têm sido identificados sapogeninas, alcólóides, esteróides e um flavonóide (CHAKRAVART *et alii* (1980); ROCCA, 1976), mas além desta informação nenhuma outra foi encontrada no Chemical Abstracts.

Na tentativa de isolamento e identificação dos compostos presentes no extrato (A) de folhas e galhos, que apresentou alta atividade antioxidante nos dois sistemas testados (Tabela 8) e não continha taninos (Tabela 9), foram hidrolizados 5 g de extrato obtendo-se 462,8 mg, os quais foram passados numa coluna cromatográfica (4,1 x 20 cm), contendo 50 g de sílica gel 60, usando-se como eluente misturas de hexano: acetato de etila em diferentes proporções. As 30 frações (50 mL) obtidas, foram monitoradas em placas de sílica gel, usando como solvente hexano: acetato de etila (7:3), observando-se que as frações 14 (28,1 mg) ($R_f = 4,0$) e 22 (56,3 mg) $R_f = 2,8$) estavam aparentemente puras. As demais frações apresentaram diversas manchas. Na Figura 22 apresentam-se os espectros UV em metanol das frações 14 (λ máx. 275 nm) e 22 (λ máx. 320 e 285 nm). Pelos máximos (λ máx.) apresentados, a fração 14 pode tratar-se de uma flavanona ou um di-hidroflavonol, ao passo que a fração 22 poderia ser uma flavona (MABRY *et alii*, 1970) com ponto de fusão = 165-168°C determinado experimentalmente. Os espectros IR em KBr, assim como o RMN'H em deuterometanol não forneceram maiores informações para a identificação dos com-

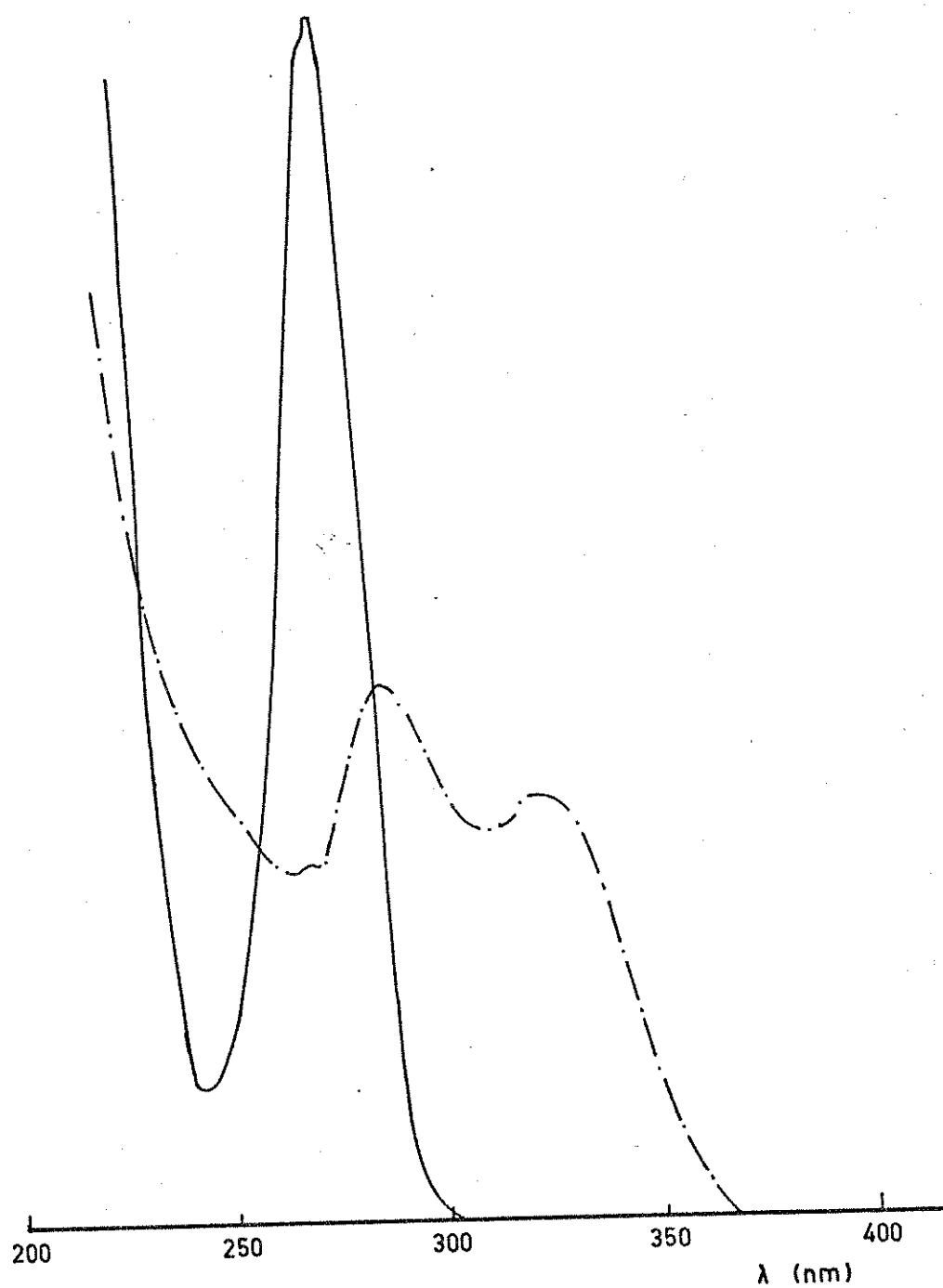


FIGURA 22 - Espectros Ultravioleta (UV) das frações 14 (—) e 22 (—.—) (coluna sílica gel) do extrato (A) hidrolizado de *Solanum viarum* em metanol.

postos, parecendo que ainda contém algumas impurezas, ou que este jam sofrendo alguma decomposição.

Com o objetivo de purificar melhor esses componentes, foi feita uma CLAE-prep. em coluna de sílica com hexano: acetato de etila (7:3) de 1,153g do extrato hidrolizado, obtendo-se 12 frações, as quais quando examinadas por CCD em sílica no mesmo solvente (Figura 23) mostraram algumas impurezas. Por esse motivo foi feita uma repurificação das primeiras 8 frações, numa coluna (2,4 x 20 cm) de sílica gel (15 g), usando como solvente uma mistura de hexano: acetato de etila em várias concentrações, obtendo-se 18 novas frações (10 mL). Estas quando monitoradas em CCD-sílica (Figura 24) indicaram a presença do mesmo composto nas frações 3-10 (20,3 mg) e outro nas frações 11-14 (35,9 mg). As frações obtidas contendo o mesmo componente foram juntadas e seus espectros de RMN¹H em deuterometanol, não apresentaram boa resolução.

O espectro UV da fração 11-14 é similar ao da fração 14 (Figura 22), na separação com coluna de sílica descrita anteriormente. Nesta fração (11-14) foi observada uma decomposição muito rápida (provavelmente oxidação), observada facilmente nas placas, já que a amostra originalmente amarelada tornou-se cinza-esverdeada em pouco tempo.

O processo de isolamento por CLAE foi repetido, tentando-se fazer tudo com o máximo cuidado e maior rapidez, para evitar a decomposição, mas sem êxito.

A separação desse extrato sem hidrolizar, também foi tentada, usando-se colunas de poliamida e sephadex LH-20 (THOMPSON *et alii*, 1972), na qual 10 g de extrato foram passados numa coluna de poliamida, usando-se metanol, resultando 200 frações de 10 mL, que foram monitoradas em placas de celulose com álcool amíli-

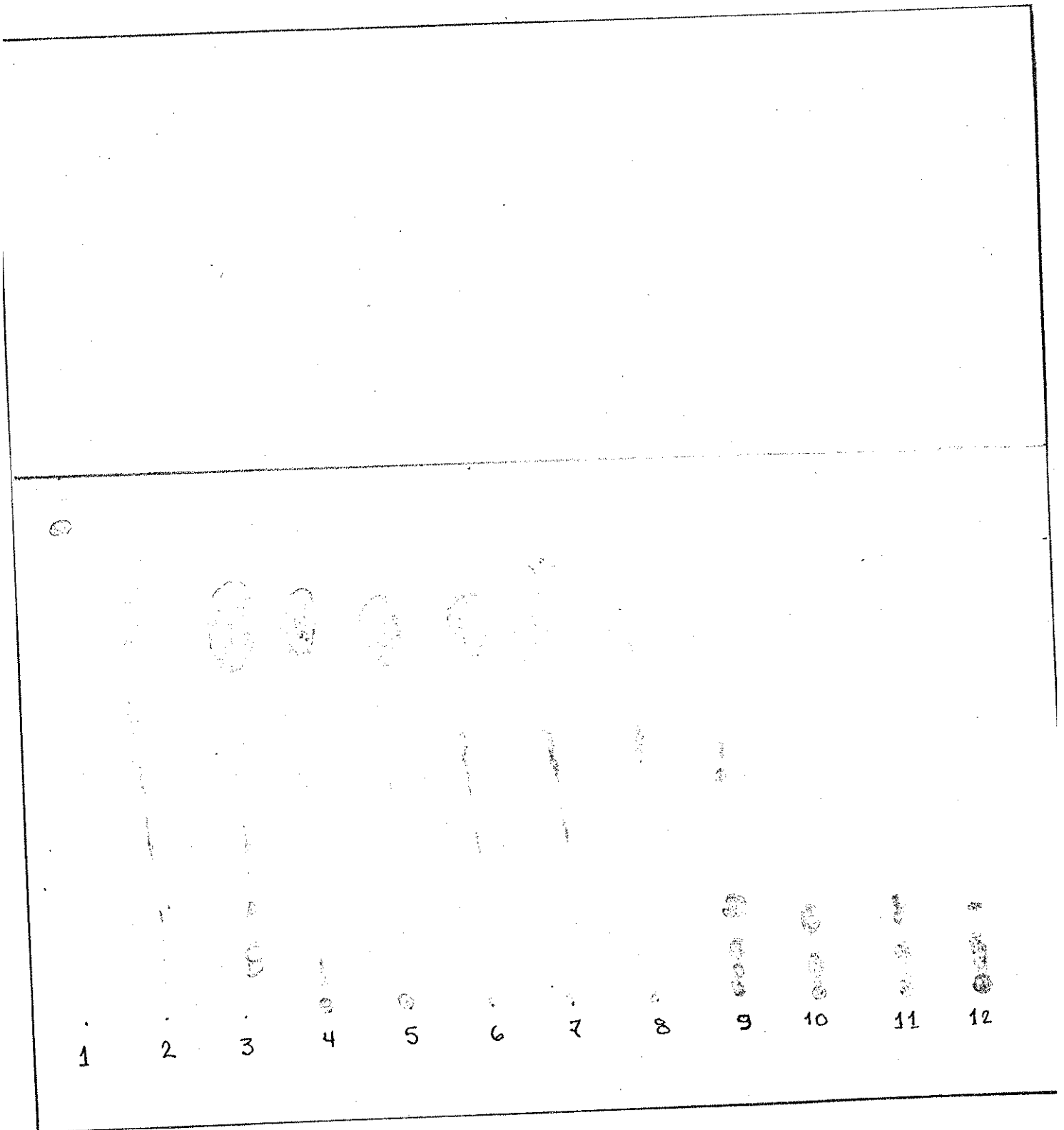


FIGURA 23 - Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel das frações obtidas por CLAE do extrato (A) hidrolizado de *Solanum viarum*.
Solvente: hexano:acetato de etila (7:3)
Revelador: UV_{254} ; $H_2SO_4/MeOH$ (1:1).

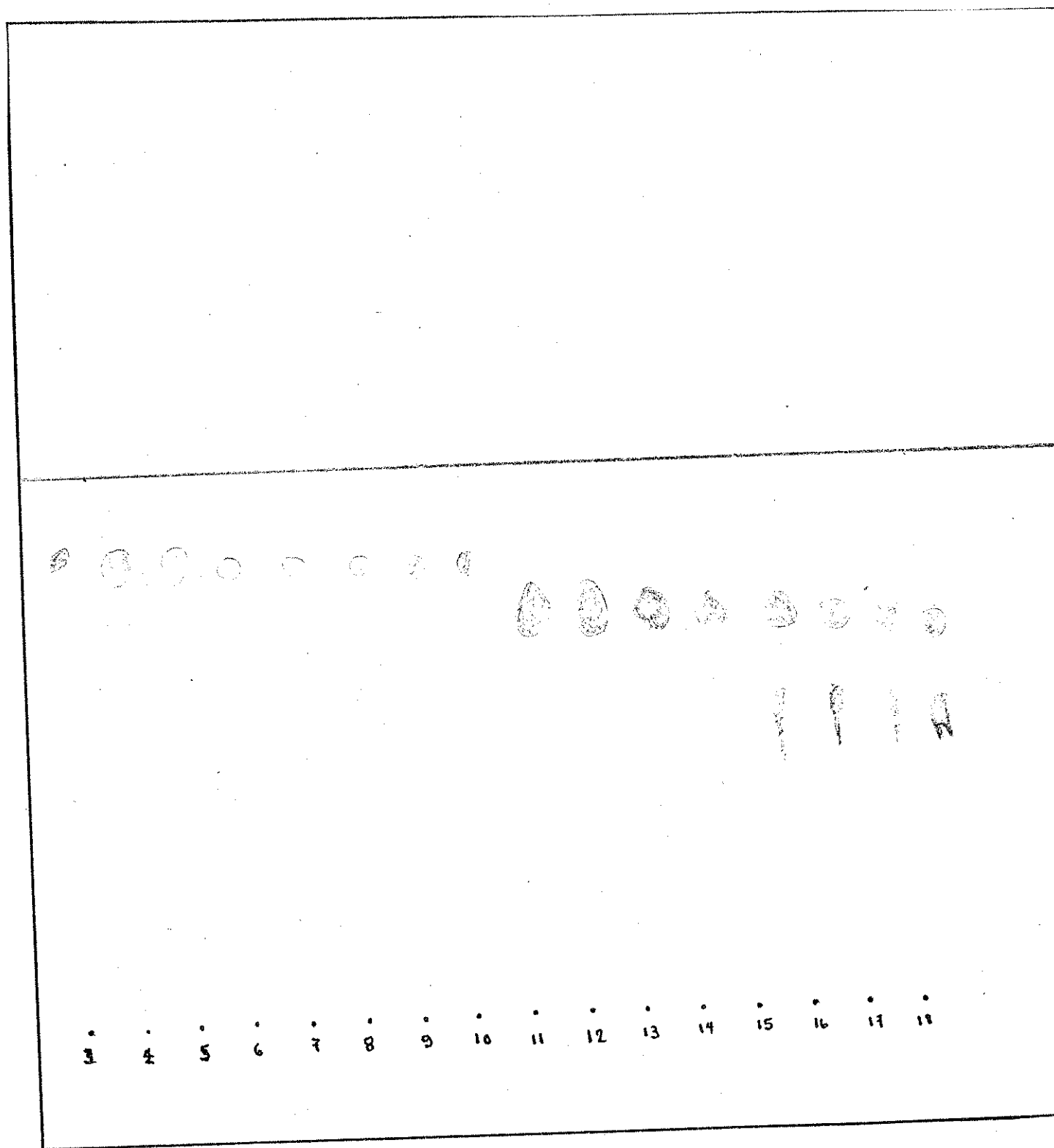


FIGURA 24 - Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel das frações obtidas na repurificação das frações 1-8 (CLAE) do extrato (A) hidrolizado de *Solanum viarum*.
Solvente: hexano:acetato de etila (7:3)
Revelador: UV_{254} : $H_2SO_4/MeOH$ (1:1).

co: ácido acético: água (8:1:1), com o seguinte resultado:

Frações: 0-30 quantidades mínimas detectadas;

31-110 compostos misturados;

111-200 ficam na origem.

As frações da faixa 31-110 (779 mg) foram reunidas e passadas numa coluna (4,1 x 20) de sephadex LH-20 (50 g), usando etanol como eluente, obtendo-se 125 frações de 10 mL, monitoradas em placas de sílica com clorofórmio: acetato de etila (1:1), observando-se que todas as frações eram misturas de vários componentes, nas quais estava presente o mesmo componente das separações anteriores (frações 14 coluna de sílica e 11-14 CLAE-prep.), o qual decompõe-se facilmente.

As frações 17-22 da coluna de sephadex LH-20 foram juntadas e passadas numa coluna de sílica gel com eluente acetato de etila e clorofórmio, em diferentes proporções, obtendo-se 15 frações (10 mL), mas sem nenhuma melhora na purificação, aparecendo, novamente vários componentes nas frações.

Piptadenia macrocarpa

O extrato (B) hidrolizado de folhas desta planta foi o que apresentou a maior atividade antioxidante no sistema lipídico (Tabela 8) de todos os extratos testados; foi também o único extrato cuja separação foi tentada, que continha alto teor de taninos (Tabela 9).

A cromatografia em camada delgada preparativa (sílica) de 200 mg do extrato (B) hidrolizado em um sistema de solvente he-

xano: acetato de etila (3:7), forneceu 4 frações com Rfs: 1=0,93 (7,3 mg); 2=0,85 (25,2 mg); 3=0,56 (21,3 mg) e 4=0,38 (20,9 mg). Os espectros UV são apresentados na Figura 25, exceto o da fração 1 por ser muito pouca quantidade o que não permitiu fazer qualquer outro teste. Por estes dados, a fração 2 (λ máx. = 372, 298 (ombro) e 252 nm) poderia tratar-se de um flavonol (3-OH), λ máx. 352-385 nm, banda I (MABRY *et alii* 1970), enquanto que as frações 3 (λ máx. 277) e 4 (λ máx. = 272) poderiam ser flavanonas ou di-hidroflavonóis, λ máx. 270-295 nm, banda II (MABRY *et alii* 1970). Porém os espectros RMN'H dos seus derivados silâñizados em CCl_4 não forneceram informações que permitissem esclarecer sua estrutura.

Os espectros de massa (EM) destas frações, mostraram que se trata de misturas complexas onde: a fração 2 contém pelo menos 8 componentes e a fração 3 pelo menos 7. A CG-EM foi tentada, mas sem resultado, já que os componentes não saíram da coluna (SE-30) durante a programação de temperatura. A fração 4 injetada diretamente no espectrometro de massa não produziu qualquer sinal, talvez por dispor de uma quantidade muito pequena (1,4 mg) para análise, embora teoricamente, tal quantidade seja descrita como suficiente.

A separação dos compostos presentes neste extrato (bruto ou seus derivados: hidrolizado, metilado ou acetilado) foi tentada também por cromatografia em papel (CP), cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-prep) com celulose e poliamida, coluna cromatográfica com sílica gel, amberlite XAD-2, celulose microcristalina, poliamida e sephadex LH-20, com diferentes sistemas de solventes, mas sem resultados satisfatórios na identificação. Os compostos isolados, supostamente puros, na CCD apresentaram sempre impurezas, sejam de outros compostos presentes no mes-

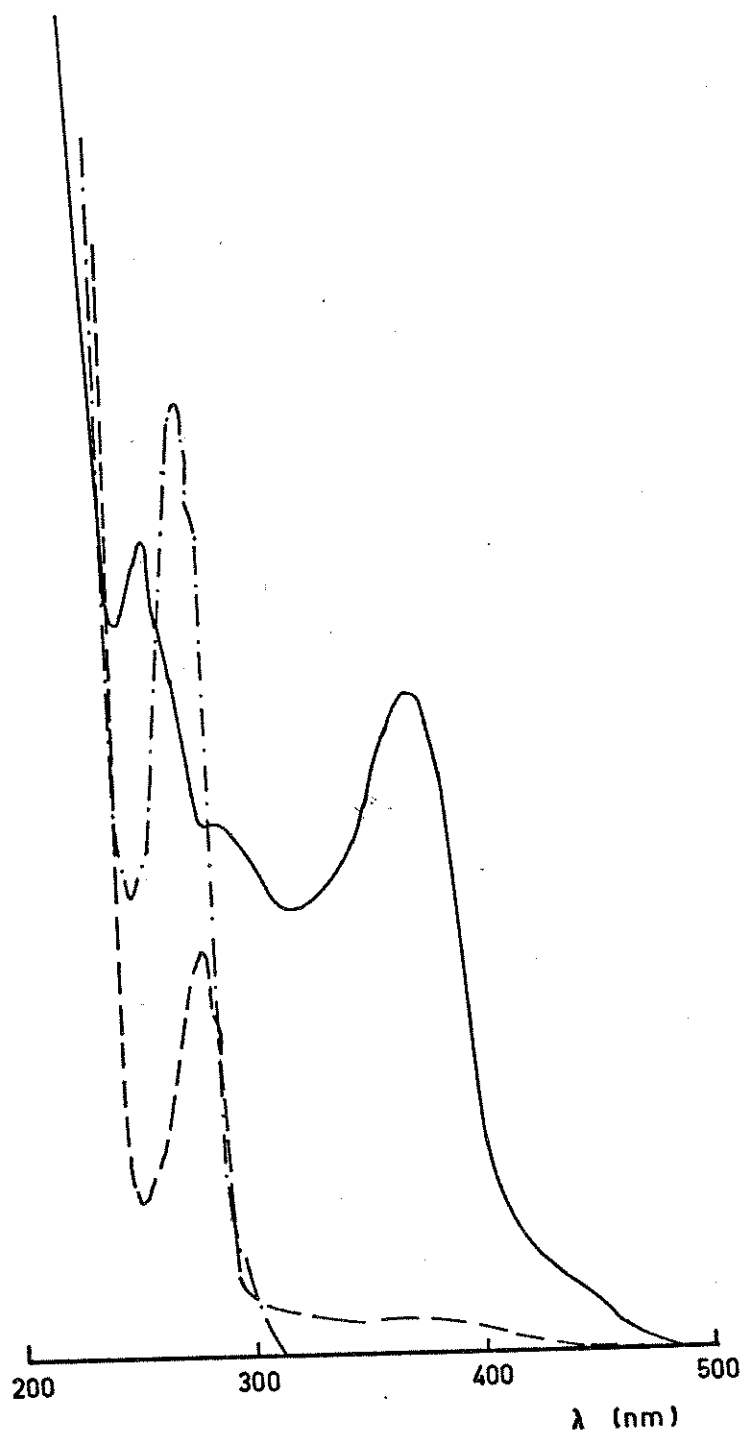


FIGURA 25 - Espectros Ultravioleta (UV) das frações 2 (—); 3 (— —) e 4 (—.—) obtidas por cromatografia em camada delgada preparativa do extrato (B) hidrolizado de *Piptadenia macrocarpa* em metanol.

mo extrato, e que é muito difícil separá-los por tratar-se de compostos com propriedades cromatográficas muito similares, ou por contaminação de outros compostos usados no tratamento cromatográfico (solventes muito polares) e na produção de derivados (reagentes), que não foi possível eliminar totalmente nas temperaturas de trabalho.

Nesta planta (*Piptadenia macrocarpa*) têm sido identificados: esteróis, flavonóides e dalbergionas no cerne (MIYAUCHI *et alii* 1976), alcalóides em sementes (FISH *et alii* 1955, 1956) e casca (IACOBUCCI & RUVERA, 1964); taninos em frutos, casca e cerne (PRADO & RICCI, 1956).

Os flavonóides, vitexina, homovitexina, orientina, e homorientina têm sido isolados em folhas de *Piptadenia peregrina* (PARIS *et alii*, 1967).

Os extratos de *Piptadenia macrocarpa* (C de Raiz e B de Folhas) aqui descritos resultam negativos no teste com revelador de Dragendorff (HARBORNE, 1973) para alcalóides.

Mikania smilacina

Na revisão bibliográfica do Chemical Abstracts sobre compostos presentes nesta planta, não foi encontrada nenhuma informação, mas alguns flavonóides têm sido identificados neste gênero (KIANG *et alii*, 1965; WAGNER *et alii*, 1967; MURADIAN *et alii*, 1977).

O extrato (A) hidrolizado (721 mg) de folhas desta planta, que não contém taninos (Tabela 9) e que mostrou alta atividade antioxidante nos dois sistemas testados (Tabela 8), foi

analisado por cromatografia de coluna, em sílica gel (50 g), usando como solvente hexano: acetato de etila em diferentes concentrações, obtendo 25 frações (50 mL).

Os espectros de massa e infravermelho das frações 9 (33,4 mg) e 13 (25,9 mg) mostraram a presença de dietilftalato. Esta substância contaminante faz parte de formulações usadas no laboratório como lubrificantes (graxa de silicone) e é carregada pelos solventes orgânicos usados na cromatografia. A presença desta substância tornou impossível a identificação dos compostos presentes no extrato.

Na tentativa do isolamento dos compostos presente nos 4 extratos anteriormente descritos, alguns problemas comuns enfrentados impediram que o trabalho atingisse completamente os seus objetivos iniciais, que eram a identificação dos compostos presentes em extratos com alta atividade antioxidante e sua posterior avaliação no estado puro.

Talvez o principal problema na separação dos compostos seja a alta polaridade dos extratos, que ocasiona inúmeras dificuldades tais como: excessiva retenção dos compostos nos adsorventes usados, obtendo assim mínimas quantidades de amostra inclusive quando grandes quantidades de extrato são utilizadas. A retenção obriga a usar solventes muito polares, que são muito difíceis de eliminar totalmente, fato que compromete a posterior identificação.

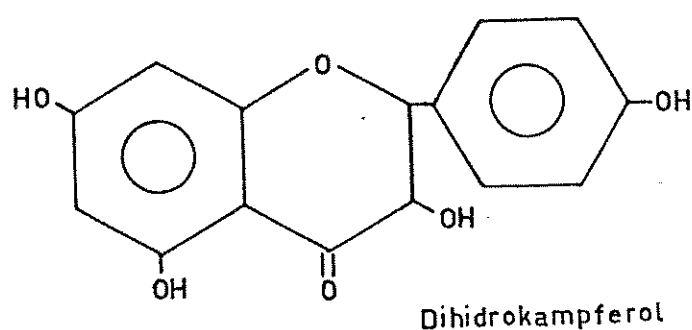
A outra alternativa para a separação seria a derivatização do extrato para diminuir sua polaridade, porém nas vezes em que foi usada a metilação e acetilação, os resultados foram igualmente negativos.

Determinação da capacidade antioxidante dos compostos isolados (5a. Etapa)

Na Tabela 11 mostra-se a atividade antioxidante das frações separadas por métodos cromatográficos, que foi determinada em óleo de soja, mesmo sem elas conterem um composto puro como era o objetivo desta etapa.

O único composto isolado, di-hidrocampferol no extrato C hidrolizado da raiz de *Cochlospermum insigne*, não apresentou nenhuma atividade antioxidante (Tabela 11) neste sistema, mas neste extrato uma fração mais polar (fração 8) mostrou uma alta potência antioxidante, bem maior que a do BHT.

Observando a estrutura do di-hidrocampferol não é estranho que sua atividade antioxidante seja nula, já que como foi exposto na revisão bibliográfica, no item de estrutura e atividade antioxidante, além do grupamento 4-C=O e 3,5-OH que esta molécula apresenta, é importante também a presença do sistema orto-hidroxila (3'-OH, 4'-OH) no anel B.



HUDSON & LEWIS (1983 a) testaram a potência antioxidante de di-hidroflavonols (fustina e taxifolina) e flavanonas (eriodictiol) em banha, encontrando que a fustina (3,7,3',4'-tetra-hidroxi di-hidroflavonol) e taxifolina (3,5,7,3',4'-penta-hidroxi di-hidroflavonol) têm alta atividade inclusive muito superior à

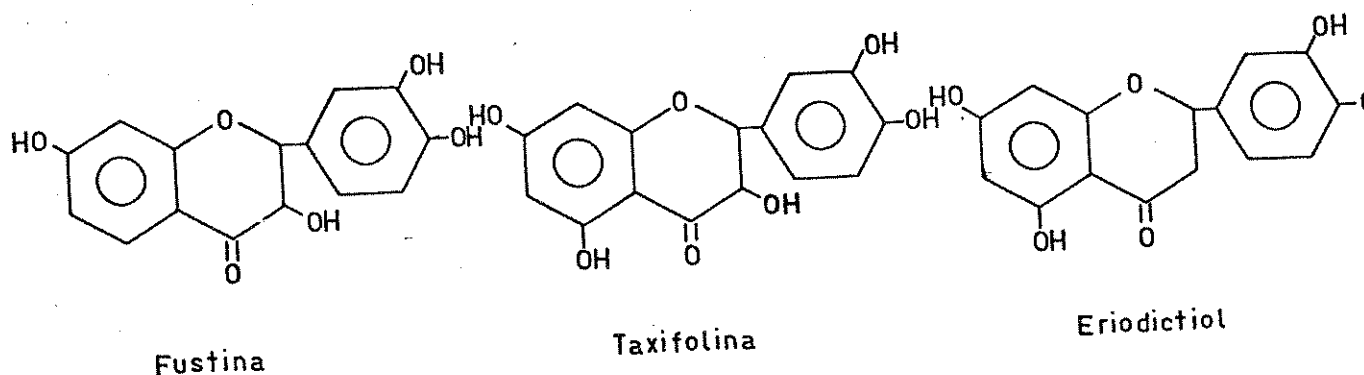
TABELA 11 - Teste de capacidade antioxidante num sistema lipídico (óleo de soja) das frações separadas dos extratos hidrolizados.

PLANTA	FRAÇÃO*	IP* FRAÇÃO	IP _{BHT}	IP _{óleo}
<i>Cochlospermum insignne</i> (C)	3	32,9	14,4	31,4
	8' (dihidroka ferol)	30,1	14,4	31,4
	8	11,1	17,3	33,0
<i>Solanum viarum</i> (A)	14	14,8	17,3	33,0
	22	14,6	17,3	33,0
	3-10	17,4	18,7	36,1
	11-14	15,9	18,7	36,1
<i>Piptadenia macrocarpa</i> (B)	2	14,0	15,7	30,8
	3	17,2	15,7	30,8
	4	16,2	15,7	30,8

* 5 mg de cada fração ou composto em 5 g de óleo de soja (0,1%).

IP = índice de Peróxido.

quercitina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi flavona), enquanto que eriodictiol mostrou atividade ligeiramente superior.



DZIEDZIC & HUDSON (1983 a) no mesmo sistema lipídico (banha) explicam que em moléculas como a taxifolina sua atividade é devida basicamente à configuração 3', 4'-di-hidroxi e que os grupos 3 e 5 hidroxila não têm significância.

Na bibliografia consultada não foi encontrada nenhuma referência sobre a atividade antioxidante do dihidrokampferol aqui isolado, em qualquer sistema aquoso ou lipídico. O teste no sistema aquoso de β -caroteno-ácido linoleico não foi efetuado por não se dispor de amostra do composto, já que toda a quantidade isolada foi usada na sua identificação.

Com exceção das duas frações menos polares do extrato hidrolizado (C) do *Cochlospermum insignis*, que não mostram nenhuma capacidade antioxidante, todas as frações analisadas mostram uma alta capacidade antioxidante, algumas vezes, melhor que a do BHT ou ligeiramente menor.

CONCLUSÕES

- 1º) A atividade antioxidante dos extratos depende do sistema usado na avaliação (aquoso ou lipídico).
- 2º) Aproximadamente um terço dos extratos testados mostrou alta atividade antioxidante num sistema aquoso.
- 3º) Nas condições do teste no sistema lipídico (óleo de soja) 16 extratos mostraram maior atividade que o BHT.
- 4º) Nove extratos mostraram alta atividade antioxidante nos dois sistemas examinados.
- 5º) A separação dos compostos presentes nos extratos liofilizados é extremamente difícil com as técnicas empregadas neste trabalho.
- 6º) As frações separadas dos extratos hidrolizados mostram alta atividade antioxidante.
- 7º) Foi identificada a presença de dihidrokampferol em raiz de *Cochlospermum insigne*.
- 8º) O dihidrokampferol não mostrou nenhuma atividade antioxidante no sistema lipídico.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMIC, K.; BOWMAN, D.F.; INGOLD, K.V. - The inhibition of autoxidation by aromatic amines. J.A.O.C.S. 47: 109, 1970.
- AHMAD, M.M.; AL-HAKIM, S.; SHEHATA, A.A. - The behaviour of phenolic antioxidants, synergists and their mixtures in two vegetable oils. Fette. Seifen. Anstrichm. 85: 479, 1983.
- ALTWICKER, E.R. - The chemistry of stable phenoxy radicals. Chem. Rev. 67: 475, 1967.
- ALZUGARAY, D. & ALZUGARAY, C. - Plantas que curam. São Paulo, TRES, 1983. v. 1-4, 556 p.
- AOCS. - Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society. 3.ed. Chicago. v. 1, 1981.
- ARYA, S.S.; RAMANUJAM, S.; VIJAYARAGHAVAN, P.K. - Refractive index as an objective method for evaluation of rancidity in edible oils and fats. J.A.O.C.S. 46: 28, 1969.
- AURAND, L.W.; BOONE, N.H.; GIDDINGS, G.G. - Superoxide and singlet oxygen in milk peroxidation. J. Dairy Sci. 60: 363, 1977.
- BATE-SMITH, E.C. - Flavonoid compounds in foods. Adv. in Food Res. 5: 261, 1954.

- BATE-SMITH, E.C. - The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance I. Dicotyledones. *J. Linn Soc.* 58: 95, 1962. In: HEGENAUER, R. ed. Chemotaxonomie der pflanzen. Band 3. Dicotyledoneae. Basil, Birkhäuser Verlag, 1964. p. 435.
- BATTERHAM, T.J. & HIGHET, R.J. - Nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids. Aust. J. Chem. 17: 428, 1964.
- BAZIN, B.; CILLARD, J.; KOSKAS, J.; CILLARD, P. - Arachidonic acid autoxidation in an aqueous media effect of α -tocopherol, cysteine and nucleic acids. J.A.O.C.S. 61: 1212, 1984.
- BELL, E.R.; RALEY, J.H.; RUST, F.F.; SEUBOLD, F.D.; VAUGHAN, W. E. - Reactions of free radicals associated with low temperature oxidation of paraffins. Faraday Soc. Discuss. 10: 242, 1951.
- BERGER, K.G. - Practical applications of an accelerated stability test to rancidity problems in food processing. J. Food Technol. 6: 253, 1971.
- BERK, Z. - Braverman's introduction to the biochemistry of foods. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing, 1976. 315 p.
- BLACK, J.F. - Metal catalyzed autoxidation. The unrecognized consequences of metal-hydroperoxide complex formation. J. Am Chem Soc. 100: 527, 1978.
- BOHM, B.A. - Flavanones and dihydroflavonols. In: HARBORNE, J.B. MABRY, T.J.; MABRY, H., eds. The flavonoids. London, Chapman & Hall, 1975. p. 560-631.

- BOOZER, C.E. & HAMMOND, G.S. - Molecular complex formation in free radical reactions. J. Am. Chem. Soc. 76:3861, 1954.
- BOOZER, C.E.; HAMMOND, G.S.; HAMILTON, C.E.; SEN, J.N. - Air oxidation of hydrocarbons II. The stoichiometry and fate of inhibitions in benzene and chlorobenzene. J. Am. Chem. Soc. 77: 3233. 1955.
- BOTTOMLEY, W.; SMITH, H.; GALSTON, A.W. - Flavonoid complexes in *Pisum sativum* - III. The effect of light on the synthesis of kaempferol and quercetin complexes. Phytochem. 5: 117, 1966.
- BRACCO, U.; LOLIGER, J.; VIRET, J.L. - Production and use of natural antioxidants. J.A.O.C.S. 58: 686, 1981.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Legislação federal do setor saúde. Brasília, 1977. p. 503-515. (Decreto Federal 55871, 1965).
- BROWNLIE, I.T. & INGOLD, K.U. - The inhibited autoxidation of styrene. Part V. The kinetics and deuterium isotope effect for inhibition by diphenylamine, phenyl-naphthylamine, and phenyl- β -naphthylamine. Can. J. Chem. 44: 861, 1966.
- BROWNLIE, I.T. & INGOLD, K.U. - The inhibited autoxidation of styrene. Part IV. The relative efficiencies and the kinetics for inhibition by N-arylanilines and N-alkyl anilines. Can. J. Chem. 45: 2419, 1967.

- BHUTANI, S.P.; CHIBBER, S.S.; SESHADRI, T.R. - Flavonoids of the fruits and leaves of *Tribulus terrestris*: constitution of tribuloside. Phytochem. 8: 299, 1969.
- BUCK, D.F. - Antioxidants in soya oil. J.A.O.C.S. 58: 275, 1981.
- BURNS, R.E. - Methods for estimation of tannin in grain sorghum. Agron. J. 63: 511, 1971.
- CALKINS, V.P. - The mechanism of the antioxygenic synergism of quinones and quinols with phosphoric acid and other acids in fat systems. J. Am. Chem. Soc. 69: 384, 1947.
- CHAKRAVARTY, A.; SAHA, C.R.; DHAR, T.K.; PAKRASHI, S.A. - Studies on Indian medicinal plants. Part LVII. Constituents of some *Solanum* species and mass spectra of nuatigenin and isonuatigenin. Indian J. Chem. 19B (6): 468, 1980. (Apud C.A. 93: 182811 R.).
- CHAN, S.S.; OSTRIC-MATYASEVIC, B.; HSIEH, O.A.; HUANG, C. - Natural antioxidants from rosemary and sage. J. Food Sci. 42:1102, 1977.
- CHAN, H.W.S.; COXON, D.T.; PEERS, K.E. & PRICE, K.R. - Oxidative reactions of unsaturated lipids. Food Chem. 9: 21, 1982.
- CHEMICAL ABSTRACTS. Chemical Abstracts Service, American Chemical Society. Columbus, 1907 - 1984. v 1 - 101.

CHIPAULT, J.R. - 32 spices gaged as antioxidants. Food Eng. 29: 134, 1957.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. - The antioxidant properties of natural species. Food Res. 17: 46, 1952.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; LUNDBERG, W.O. - Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions. Food Res. 20: 443, 1955.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; LUNDBERG, W.O. - The antioxidant properties of spices in foods. Food Technol. 10: 209, 1956.

CLARK-LEWIS, J.W. & PORTER, L.J. - Phytochemical survey of the heartwood flavonoids of *Acacia* species from arid zones of Australia. Aust. J. Chem. 25: 1943, 1972.

COOK, I.F. & KNOX, J.R. - Flavonoids from *Cochlospermum gilli vraei*. Phytochem. 14: 2510, 1975.

COONEY, P.M.; EVANS, C.D.; SCHWAB, A. W.; COWAN, J.C. - Influence of heat on oxidative stability and an effectiveness of metal-inactivating agents in vegetable oils. J.A.O.C.S. 35: 152, 1958.

CORREIA, M.P. - Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1926-1978. v. 1-6.

- CRAWFORD, D.L.; SINNHUBER, R.O.; AFT, H. - The effect of methylation upon the antioxidant and chelation capacity of quercitin and dihydroquercitin in lard substrate. J. Food Sci. 26: 139, 1961.
- CROSSLEY, A. & THOMAS, A. - Keeping properties of edible oils
III. Identity of trace materials adsorbed from peanut oil by chromatography on alumina. J.A.O.C.S. 41: 95, 1964.
- DASS, H.C. & WEAVER, G.M. - Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. J. Chromatography 67: 105, 1972.
- DEAN, F.M. - Naturally occurring oxygen ring compounds. London, Butterworths, 1963. p. 318 - 359.
- DESROSIER, N.W. & DESROSIER, J.N. - The technology of food preservation. 4. ed. Wesport, AVI Publishing, 1977. 558 p.
- DETTY, W.E.; HESTON, B.O.; WENDER, S.H. - Amphoteric titration of some flavonoid compounds with cupric sulfate. J. Am. Chem. Soc. 77: 162, 1955.
- DEWAR, M.J.S. & JONES, R. - Computer compilation of molecular weights and percentage compositions for organic compounds. Oxford, Pergamon Press, 1969. p. 55.
- DILLARD, C.J. & TAPPEL, A.L. - Fluorescent products from reaction of polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl ethanolamine and phenylalanine. Lipids 8: 183, 1973.

DREYER, D.L. & BERTELLI, D.J. - The structure of zapotin. Tetra-
hedron. 23: 4607, 1967.

DUTTON, H.J.; SCHWAB, A.W.; MOSER, H.A.; COWAN, J.C. - The
flavor problem of soybean oil IV. Structure of compounds coun-
teracting the effect of prooxidant metals. J.A.O.C.S. 25: 385,
1948.

DZIEDZIC, S.Z. & HUDSON, B.J.F. - Hydroxy isoflavones as anti-
oxidants for edible oils. Food Chem. 11: 161, 1983a.

DZIEZIC, S.Z. & HUDSON, B.J.F. - Polyhydroxy chalcones and
flavanones as antioxidants for edible oils. Food Chem. 12:
205, 1983b.

EASTMAN CHEMICAL PRODUCTS INC. - Tenox food-grade antioxidants.
Kingsport, 1974, 11p. Publication n° ZG - 109A.

EMANUEL, N.M. & LYASKOVSKAYA, Y.N. - The inhibition of fat oxida-
tion processes Oxford, Pergamon Press, 1967. 389p.

EVANS, C.D.; SCHWAB, A.W.; MOSER, H.A.; HAWLEY, J.E.; MELVIN, E.
H. - The flavor problem of soybean oil. VII. Effect of
trace metals. J.A.O.C.S. 28: 68, 1951.

EVANS, C.D.; FRANKEL, E.N.; COONEY, P.M.; MOSER, H.A. - Effect
of autoxidation prior to deodorization on oxidative and flavor
stability of soybean oil. - J.A.O.C.S. 37: 452, 1960.

- FARMER, E.H. - α -Methylenic reactivity in olefinic and polyolefinic systems. Trans. Faraday Soc. 38: 340, 1942a.
- FARMER, E.H.; BLOOMFIELD, G.F.; SUNDRALINGAM, A.; SUTTON, D.A. - The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. Trans. Faraday Soc. 38: 348, 1942b.
- FARMER, E.H.; KOCH, H.P.; SUTTON, D.A. - The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part VII. Rearrangement of double bonds during autoxidation. J. Chem. Soc. 541, 1943.
- FARMER, E.H. - Peroxidation in relation to olefinic structure. Trans. Faraday Soc. 42: 228, 1946a.
- FARMER, E.H. & SUTTON, D.A. - The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds XI. Double bond movement during the autoxidation of a mono-olefin. J. Chem. Soc. 10, 1946b.
- FEENSTRA, W.H. & MEIJBOOM, P.W. - 2 - trans-nonenal, the hardened flavor present in hydrogenated peanut oil. J.A.O.C.S. 48: 684, 1971.
- FIORITI, J.A.; KANUK, M.J.; SIMS, R.J. - Chemical and organoleptic properties of oxidized fats. J.A.O.C.S. 51: 219, 1974.
- FISH, M.S.; JOHNSON, N.M.; HORNING, E.C. - *Piptadenia* alkaloids. Indole bases of *Piptadenia peregrina* and related species. J. Am. Chem. Soc. 77: 5892, 1955.

FISH, M.S.; JOHNSON, N.M.; HORNING, E.C. - Tertiary-amine oxide rearrangements. J.Am.Chem.Soc. 78: 3668, 1956.

FISHWICK, M.J. & SWOBODA, P.A.T. - Measurement of oxidation of polyunsaturated fatty acids by spectrophotometric assay of conjugated derivatives. J. Sci. Food Agric. 28: 387, 1977.

FRANK, J.; GEIL, J.V.; FREASO, R. - Automatic determination of oxidation stability of oil and fatty products. Food Technol. 36: 71, 1982.

FRANKEL, E.N. - Hydroperoxides. In: SCHULTZ, H.W.; DAY, E.A.; SINNHUBER, R. O., eds. Symposium on foods: lipids and their oxidation. Westport, AVI Publishing, 1962. p 51-78.

FRANKEL, E.N. - Lipid oxidation. Prog. Lipid Res. 19: 1, 1980.

FRANKEL, E.N. - Volatile lipid oxidation products. Prog. Lipid Res. 22: 1, 1983.

FRANKEL, E.N.; EVANS, C.D.; COWAN, J.C. - Thermal dimerization of fatty ester hydroperoxides. J.A.O.C.S. 37: 418, 1960.

FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E.; ROHWEDDER, W.K.; KHAMBAY, B.P.S.; GARWOOD, R.F.; WEEDON, B.C.L. - Analysis of autoxidized fats by Gas chromatography - Mass spectrometry I. Methyl oleate. Lipids 12: 901, 1977a.

FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E.; ROHWEDDER, W.K.; KHAMBAY, B.P.S.; GARWOOD, R.F.; WEEDON, B.C.L. - Analysis of autoxidized fats by

Gas chromatography - Mass spectrometry II. Methyl linoleate.
Lipids 12: 908, 1977b.

FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E.; ROHWEDDER, W.K.; KHAMBAY, B.P.S.; GARWOOD, R.F.; WEEDON, B.C.L. - Analysis of autoxidized fats by Gas chromatography - Mass spectrometry III. Methyl linolenate.
Lipids 12: 1055, 1977c.

GADDIS, A.M.; ELLIS, R.; CURRIE, G.T.; THORNTON, F.E. - Carbonyls in oxidizing fat. X. Quantitative differences in individual aldehydes isolated from autoxidized lard by mild methods of extraction. J.A.O.C.S. 43: 242, 1966.

GANGULY, A.K. & SESHADRI, T.R. - Leucoanthocyanidins of plants. Part III. Leuco pelargonidin from *Eucalyptus calophylla* kino. J. Chem. Soc. : 2787, 1961.

GEISSMAN, T.A. ed. - The chemistry of flavonoid compounds. New York, Mac Millan, 1962. 666p.

GLAVIND, J. & HOLMER, G. - Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical diphenyl - β - picrylhydrazyl. J.A.O.C.S. 44: 539, 1967.

GRAY, J.I. - Measurement of lipid oxidation: a review. J.A.O.C.S. 55: 539-546, 1978.

GUGGOLZ, J.; LIVINGSTON, A.L.; BICKOFF. - Detection of daidzein, formononetin, genistein, and biochanin A in forages. J. Agric. Food Chem. 9: 330, 1961.

- GYORGY, P.; MURATA, K.; IKEHATA, H. - Antioxidants isolated from fermented soybean (Tempeh). Nature 203: 870, 1964.
- HAMMERSCHMIDT, P.A. & PRATT, D.E. - Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci. 43: 556, 1978.
- HAMMOND, G.S.; BOOZER, C.E.; HAMILTON, C.E.; SEN, J.N. - Air oxidation of hydrocarbons. III. Mechanism of inhibitor action in benzene and chlorobenzene solution. J. Am. Chem. Soc. 77: 3238, 1955.
- HARBORNE, J.B. - The chromatography of the flavonoid pigments. J. Chromatography 2: 581, 1959.
- HARBORNE, J.B.; GOTTLIEB, O.R.; TAVEIRA, M.M. - Occurrence of the isoflavone afromosin in cabreuva wood. J. Org. Chem. 28: 881, 1963.
- HARBORNE, J.B. - Comparative biochemistry of the flavonoids. London, Academic Press, 1967.
- HARBORNE, J.B. - Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. London, Chapman & Hall, 1973. 278p.
- HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. eds. - The flavonoids. New York, Academic Press, 1975. 631 p.
- HASLAM, E. - Chemistry of vegetable tannins. New York, Academic Press, 1966. 179 p.

- HEIMANN, W. & REIFF, F. - The relation between chemical constitution and antioxidant activity of flavonols. Fette u Seifen 55: 451, 1953, apud.
- PRATT, D.E. & WATTS, B.M. - The antioxidant activity of vegetable extracts I. Flavone aglycones. J. Food Sci. 29: 27, 1964.
- HENICK, A.S.; BENCA, M.F.; MITCHELL, J.H. - Estimating carbonyl compounds in rancid fats and foods. J.A.O.C.S. 31: 88, 1954.
- HENRICK, C.A. & JEFFERIES, P.R. - The chemistry of the Euphorbiaceae. VIII. New flavones from *Ricinocarpus stylosus*. Aust. J. Chem. 17: 934, 1964.
- HERRMANN, K. - Flavonols and flavones in food plants: a review. J. Food Technol. 11: 433, 1976.
- HERZ, W.; GIBAJA, S.; BHAT, S.V.; SRINIVASAN, A. - Dihydroflavonols and other flavonoids of *Eupatorium* species. Phytochem. 11: 2859, 1972.
- HIGGINS, J.W. & BLACK, H.C. - Preliminary comparison of the stabilizing effect of several recently proposed antioxidants for edible fats and oils. Oil & Soap 21: 277, 1944.
- HILLIS, W.E. & CARLE, A. The chemistry of eucalypt kinos. IV. *Eucalyptus hemipholia* kino. Aust. J. Chem. 16: 147, 1963.

- HOLM, U.; EKBOM, K.; WODE, G. - Determination of the extent of oxidation of fats. J.A.O.C.S. 34: 606, 1957.
- HUDSON, B.J.F. & LEWIS, J.I. - Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils structural criteria for activity. Food Chem. 10: 47, 1983a.
- HUDSON, B.J.F. & LEWIS, J.I. - Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists. Food Chem. 10: 111, 1983b.
- HUDSON, B.J.F. & MAHGOUB, S.E.O. - Naturally-occurring antioxidants in leaf lipids. J.Sci. Food Agric. 31: 646, 1980.
- HUDSON, B.J.F. & MAHGOUB, S.E.O. - Synergism between phospholipids and naturally-occurring antioxidants in leaf lipids. J. Sci. Food Agric. 32: 208, 1981.
- IACOBUCCI, G.A. & RUBEDA, E.A. - Bases derived from tryptamine in Argentine *Piptadenia species*. Phytochemistry 3: 465, 1964.
- IKAN, R. - Natural products: a laboratory guide. Jerusalem, Israel Universities Press, 1969. p. 1-22.
- IKEHATA, H.; WAKAIZUMI, M.; MURATA, K. - Antioxidant and antihe-molytic activity of a new isoflavona, "Factor 2" isolated from Tempeh. Agr. Biol. Chem. 32: 740, 1968.

- INGOLD, K.U. - Metal catalysis. In: SCHULTZ, H.W.; DAY, E.A.; SINNHUBER, R.D., eds. Symposium on foods: lipids and their oxidation. Wesport, AVI Publishing, 1962. p 93-122.
- JANES, N.F. & MORGAN, J.W.W. - The occurrence of dihydrokaempferol in *Nothofagus* species. J. Chem. Soc. 2560, 1960.
- JARVI, P.K.; LEE, G.D.; ERICKSON, D.R.; BATKUS, E.A. - Determination of the extent of rancidity of soybean oil by Gas chromatography compared with peroxide value. J.A.O.C.S. 48: 121, 1971.
- JOHNSTON, A.E.; ZILCH, K.T.; SELKE, E.; DUTTON, H.J. - Analysis of fat acid oxidation products by countercurrent distribution methods. V. Low-temperature decomposition of methyl linoleate hydroperoxide. J.A.O.C.S. 38: 367, 1961.
- JOLY, A.B. - Botanica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo, Editora Nacional, 1979. 777p.
- KEENEY, M. - Secondary degradation products. In: SCHULTS, W.; DAY, E.A.; SINNHUBER, R.O.; eds. Symposium on foods: lipids and their oxidation. Wesport, AVI Publishing, 1962, p. 79-89.
- KELLEY, G.G. & WATTS, B.M. - Effects of copper chelating agents on the pro-oxidative activity of ascorbic acid with unsaturated fats. Food Res. 22: 308, 1957.
- KEPPLER, J.G.; SCHOLS, J.A.; FEENSTRA, W.H.; MEIJBOOM, P.W. - Components of the hardening flavor in hardened linseed and soybean oil. J.A.O.C.S. 42: 246, 1965.

KIANG, A.K.; SIM, K.Y.; GOH, J. - Constituents of *Mikania cordata*. Isolation of mikanin, epidriedelinol, and fumaric acid; the structure of mikanin. J. Chem. Soc.: 6371, 1965.

KING, A.E.; ROSCHEN, H.L.; IRWIN, W.H. - An accelerated stability test with the peroxide value as an index. Oil & Soap 10: 105, 1933.

KING, F.E.; CLARK-LEWIS, J.W.; FORBES, W.F. - The chemistry of extractives from hardwoods. Part. XXV. (-) - epiafzelechin, a new member of the catechin series. J. Chem. Soc.: 2948, 1955.

KORYCKA-DAHL, M. & RICHARDSON, T. - Initiation of oxidative changes in foods. J. Dairy Sci. 63: 1181, 1980.

KRUKOVSKY, V.N. & LOOSLI, J.K. - Further studies on the influence of tocopherol supplementation on the vitamin content of the milk fat, stability of milk and milk and fat production. J. Dairy Sci. 35: 834, 1952.

KURTH, E.F. & CHAN, F.L. - Dihydroquercetin as an antioxidant. J.A.O.C.S. 28: 433, 1951.

LEA, C.H. & SWOBADA, P.A.T. - The flavour of aliphatic aldehydes. Chem. Ind. 46: 1289, 1958.

LEA, C.H. & SWOBADA, P.A.T. - A simple vacuum distillation procedure for determination of the volatile carbonyl content of autoxidizing edible fats. J. Sci. Food Agric. 13: 148, 1962.

LETAN, A. - The relation of structure to antioxidant activity of quercitin and some of its derivatives I. Primary activity. J. Food Sci. 31: 518, 1966a.

LETAN, A. - The relation of structure to antioxidant activity of quercitin and some of its derivatives II. - Secondary (metal-complexing) activity. J. Food Sci. 31: 395, 1966b.

LEWIS, E.J. & WATTS, B.M. - Antioxidant and copper binding properties of onions. Food Res. 23: 274, 1958.

LEWIS, W.R.; QUACKENBUSH, F.W.; DeVRIES, T. - Polarographic studies of organic peroxides in nonaqueous solutions. Anal. Chem. 21: 762, 1949.

LILLARD, D.A. - Effect of processing on chemical and nutritional changes in food lipids. J. Food Protection 46: 61, 1983.

LILLARD, D.A. & DAY, E.A. - Degradation of monocarbonyls from autoxidizing lipids. J.A.O.C.S. 41: 549, 1964.

LIPS, A.; CHAPMAN, R.A.; Mc FARLANE, W.D. - The application of the ferric thiocyanate method to the determination of incipient rancidity in fats and oils. Oil & Soap 20: 240, 1943.

LIST, G.R.; EVANS, C.D.; KWOLEK, W.F.; WARNER, K.; BOUNDY, B.K.; COWAN, J.C. - Oxidation and quality of soybean oil: a preliminary study of the anisidine test. J.A.O.C.S. 51: 17, 1974.

LUNDBERG, W.O. - Autoxidation and antioxidants. New York, Interscience Publishers, 1961 - 1962. v. 1-2.

LUNDE, G.; LANDMARK, L.H.; GETHER, J. - Sequestering and exchange of metal ions in edible oils containing phospholipids. J.A.O.C.S. 52: 207, 1976.

MABRY, T.J.; KAGAN, J.; RÖSLER, H. - *Baptisia* flavonoids: nuclear magnetic resonance analysis. Phytochem. 4: 487, 1965.

MABRY, T.J. & MARKHAM, K.R. - Mass spectrometry of flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H., eds. The Flavonoids. London, Chapman & Hall, 1975. p 78-126.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. - The systematic identification of flavonoids. New York, Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MacDONALD, B.; GRAY, I.J.; UEBERSAX, M.A.; MORTON, I.D. - A statistical evaluation of three methods for measuring lipid oxidation in a model system. Food. Chem. 8: 21, 1982.

MARKHAM, K.R. - Isolation techniques for flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H., eds. The flavonoids. London, Chapman & Hall, 1975. p. 1-43.

MARKHAM, K.R. & MABRY, T.J. - A procedure for the ultraviolet spectral detection of ortho-dihydroxyl groups in flavonoids. Phytochem. 7: 1197, 1968.

- MARKHAM, K.R. & MABRY, T.J. - Ultraviolet - visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: HARBORNE, J. N.; MABRY, T.J.; MABRY, H., eds. The flavonoids. London, Chapman & Hall, 1975. p. 45-77.
- MIYAUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MINAMI, K. - Extratives of hardwood. IX - Extratives from the hardwood of *Piptadenia* sp. - Mokuzaï Gakkaishi 22 (1): 47, 1976. (Apud C.A. 84: 147704 a.).
- MORRIS, S.G.; MEYERS, J.S.; KIP, M.L.; RIEMENSCHNEIDER, R.W. - Metal deactivation in lard. J.A.O.C.S. 27: 105, 1950.
- MOURA, D. - A crista-de-galo acaba com vermes e a catuaba com a impotência; o fedegoso... Cuidado... Esses poderes das ervas medicinais nem sempre são verdadeiros; além disso, elas têm sido falsificadas... Jornal da Tarde, São Paulo, 25 jun. 1985, p.11, col. 5.
- MURADIAN, J.; MOTIDOME, M.; FERREIRA, P.C.; BRAZ-FILHO, R. - Flavonols and (-) kaur-16-en-19-oic acid from *Mikania hirsutissima* D.C. var. *hirsutissima*. Rev. Latinoam. Quim. 8: 88, 1977.
- NAGY, J.J.; VIBRANS, F.C.; KRAYBILL, H.R. - An application of the Barcroft - Warburg apparatus to the study of antioxidants in fats. Oil & Soap. 21: 349, 1944.
- NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK, Y. - Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. J. Agric. Food Chem. 24: 1174, 1976.

- NAWAR, W.W. & FAGERSON, I.S. - Direct as chromatographic analysis as an objetive method of flavor measurement. Food Technol. 16: 107, 1962.
- NOGUEIRA, P.L. - Chemical study of *Cochlospermum angolense*. Anais Fac. Farm. Porto. 16: 105, 1956. (Apud C.A. 51:9094 a.)
- ODUMOSU, O.T.; SINHA, J.; HUDSON, B.J.F. - Comparison of chemical and sensory methods of evaluating thermally oxidised groundnut oil. - J. Sci. Food Agric. 30: 515, 1979.
- PARIS, R.R.; SAINT-FIRMIN, A.; ETCHEPARE, S. - Alkaloids and flavonoids of *Piptadenia peregrina* from Haiti. The adsence of alkaloids in *Piptadenia africana*. Ann. Pharm. 25: 509, 1967. (Apud. C.A. 68:10179 h.).
- PARR, L.J. & SWOBODA, P.A.T. - The assay of conjugable oxidation products applied to lipid deterioration in stored foods. J. Food Technol. 11: 1, 1976.
- PARKHURST, R.M.; SKINNER, W.A.; STURM, P.A. - The effect of various concentrations of tocopherols and tocopherol mixtures on the oxidative stability of a sample of lard. J.A.O.C.S. 45: 641, 1968.
- PAUL, S. & ROYLANCE, A. - Keeping properties of edible oils-Part I. The use of accelerated tests for assessment of the keeping properties of oils and the value of antioxidants. J.A.O.C.S. 39: 163, 1962.

- PAULOSE, M.M. & CHANG, S.S. - Chemical involved in the deep fat frying of foods. Characterization of nonvolatile products of trilinolein. J.A.O.C.S. 50: 147, 1973.
- PHILIP, F. - An investigation of the antioxidants in textured vegetable protein product from soy flour. Ph.D. thesis, Purdue University, 1974. apud.
- HAMMERSCHMIDT & PRATT. Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food. Sci. 43: 556, 1978.
- PRADO, L.L. & RICCI, E. - Systematic study of the tannin content of various indigenous species. Anales Admin. Nacl. Bosques, Rep. Arg. 1956. p. 7-17. (Apud C.A. 51; 9803b.)
- PRATT, D.E. - Lipid antioxidants in plant tissue. J. Food Sci. 30: 737, 1965.
- PRATT, D.E. - Water soluble antioxidant activity in soybeans. J. Food Sci. 37: 322, 1972.
- PRATT, D.E. & BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. J. Food Sci. 44: 1720, 1979.
- PRATT, D.E. & MILLER, E.E. - A flavonoid antioxidant in spanish peanuts. J.A.O.C.S. 61: 1064, 1984.
- PRATT, D.E. & WATTS, B.M. - The antioxidants activity of vegetable extracts I. - Flavone aglicones. J. Food Sci. 29: 27, 1964.

- PRICE, M.L. & BUTLER, L.G. - Rapid visual and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 25: 1268, 1977.
- PRICE, M.L.; Van SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. - A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 26 (5): 1214, 1978.
- RANDERATH, K. - Thin-layer chromatography. New York, Academic Press, 1963. p. 216.
- RAWLS, H.R. & Van SANTEN, P.J. - A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. J.A.O.C.S. 47: 121, 1970.
- REMBaum, A. & SZWARC, M. - Methyl affinities of quinones. J. Am. Chem. Soc. 77: 4468, 1955.
- RICHARDSON, G.A.; EL-RAFEY, M.S.; LONG, M.L. - Flavones and flavone derivatives as antioxidants. J. Dairy Sci. 30: 397, 1947.
- ROCCA, M.A. - Steroidal components of *Solanum viarum* Dun. Rev. Fac. Farm. Odontol. Araraquara 10: 329, 1976 (Apud. C.A. 89: 143373) x.
- SCHULER, P. - Autoxidation of fats and its prevention with antioxidants. Basel, F. Hoffmann La Roche & Co., 1980. 6p.

- SCHWAB, A.W.; MOSER, H.A.; GURLEY, R.S.; EVANS, C.D.D. - The flavor problem of soybean oil. XIII. Sulfur coordination compounds effective in edible oil stabilization. J.A.O.C.S. 30: 413, 1953.
- SCOTT, G. - Atmospheric oxidation and antioxidants. London, Elsevier, 1965. 528 p.
- SEHER, A. - Changes in lipids and their analysis. In: EUROPEAN CONFERENCE ON FOOD CHEMISTRY, 2.; EURO FOOD CHEM II, March 15-18, 1983. Proceedings. Rome, Federation of European Chemical Societies, 1983. p. 57-70. (Fecs event n. 45).
- SELKE, E.; MOSER, H.A.; ROHWEDDER, W.K. - Tandem gas chromatography - mass spectrometry analysis of volatiles from soybean oil. J.A.O.C.S. 47: 393, 1970.
- SHERWIN, E.R. - Antioxidants for vegetable oils. J.A.O.C.S. 53: 430, 1976.
- SHERWIN, E.R. - Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. J.A.O.C.S. 55: 809, 1978.
- SIMPSON, T.H. & URI, N. - Hydroxy flavones as inhibitors of anaerobic oxidation of unsaturated fatty acids. Chem. & Ind.: 956, 1956.

SINNHUBER, R.O.; YU, T.C., CHANG, Y.T. - Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. Food Res. 23: 626, 1958.

SMOUSE, T.H. - A review of soybean oil reversion flavor. J.A.O.C.S. 56: 747 A, 1979.

SMOUSE, T.H. & CHANG, S.S. - A systematic characterization of the reversion flavor of soybean oil. J.A.O.C.S. 44: 509, 1967.

SPANNUTH, H.T.; McGUINE, T.H.; CRAPPLE, G.A. - Improvement of keeping quality of edible fats by some commercially available tannins. Oil & Soap 23: 110, 1946.

STAHL, E. - Thin-layer chromatography: a laboratory handbook. 2, ed. New York, Springer-Verlag, 1969. p. 895.

STUCKEY, B.N. - Antioxidants. In: SCHULTZ, H.W.; DAY, E.A.; SINNHUBER, R.O., eds. Symposium on foods: lipids and their oxidation. Westport, AVI. Publishing, 1962. p. 139-158.

STUCKEY, B.N. - Antioxidants as food stabilizers. In. FURIA, T. E., ed. Handbook of food aditives. 2. ed. Boca Raton. CRC, 1972, v.1, p. 185-223.

- SWOBODA, P.A.T. & LEA, C.H. - Determination of the peroxide value of edible fats by colorimetric iodometric procedures. Chem. & Ind.: 1090, 1958.
- TABER, D.F. - TLC mesh column chromatography. J. Org. Chem. 47: 1351, 1982.
- TARLADGIS, B.G.; PEARSON, A.M.; DUGAN, L.R. - The chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for the determination of oxidative rancidity in food. I. Some important side reactions. J.A.O.C.S. 39: 34, 1962.
- TARLADGIS, B.G.; WATTS, B.M.; YOUNATHAN, M.T.; DUGAN, L. - A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid food. J.A.O.C.S. 37: 44, 1960.
- THOMPSON, R.S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R.J.N. - Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction: the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. J.C.S. Perkin I.: 1387, 1972.
- TROMBLY, R. & TAPPEL, A.L. - Fractionation and analysis of fluorescent products of lipids peroxidation. Lipids 10: 441, 1975.
- TSOUKALAS, B. & GROSCH, W. - Analysis of fat deterioration. Comparison of some photometric tests. J.A.O.C.S. 54: 490, 1977.
- VYNCKE, W. - Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackarel (*Scorpaenidae*). Fette Seifen Anstrichm. 17: 239, 1970 a.

- VINCKE, W. - Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. Fette Seifen Anstrichm. 12: 1084, 1970b.
- WAGNER, H.; HOERHAMMER, L.; HOEER, R.; FARKAS, L. - Synthesis of mikanin, a flavonol from *Mikania cordata*. Chem. Ber. 100 (5) 1768, 1967. (Apud C.A. 67:114025).
- WARNER, K.; EVANS, C.D.; LIST, G.R.; BOUNDY, B.K.; KWOLEK, W. F. - Pentane formation and rancidity in vegetable oils and in potato chips. J. Food. Sci. 39: 761, 1974.
- WHEELER, D.H. - Peroxide formation as a measure of antioxidative deterioration. Oil & Soap 9: 89, 1932
- WHITTERN, C.C.; MILLER, E.E.; PRATT, D.E. - Cottonseed flavonoids as lipid antioxidants. J.A.O.C.S. 61: 1075, 1984.
- ZIELS, N.W. & SCHMIDT, W.H. - Catalytic effect of metals and light on fats and oils. Oil & Soap. 22: 327, 1945.