UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

COMPOSTOS FENÓLICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ERVAS CONSUMIDAS NA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA

Pollyane da Silva Port's

Tecnóloga em Alimentos

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Port's, Pollyane da Silva
P838c Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira / Pollyane da Silva Port's. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ervas. 2. Compostos fenólicos. 3. Antioxidantes. 4. CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) 5. Região Amazônica. I. Prado, Marcelo Alexandre. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars-fea)

Título em inglês: Phenolic compounds and antioxidant potential of herbs consumed in the Brazilian Amazonian region
Palavras-chave em inglês (Keywords): Herbs, Phenolic compounds, Antioxidants, HPLC, Amazonian region
Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos
Banca examinadora: Marcelo Alexandre Prado
Helena Teixeira Godoy
Claudia Hoffmann Kowalski Schroder
Data da defesa: 08/04/2011
Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por Pollyane da Silva Port's, aprovado pela comissão julgadora em 08 de abril de 2011.

_____

Dr. Marcelo Alexandre Prado
FEA – UNICAMP
Presidente

_____

Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA – UNICAMP
Membro

_____

Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder
Laboratório Nacional Agropecuário - SP
Membro

_____

Severino Matias de Alencar
ESALQ-USP
Membro

_____

Raquel Grando Oliveira
UFRJ
Membro

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

(Fernando Pessoa)

"A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável."

(Mahatma Gandhi)

Dedico este trabalho aos meus familiares pelo incentivo e especial aos meus pais Rubens e Fátima, principalmente a minha mãe por todo o seu amor, dedicação e apoio incondicional ao longo de toda a minha vida; a minha tia Alice que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis; a minha Tia Mitze pelo seu enorme carinho mesmo depois de anos; ao mano Thyago; a minha avó Carmém; *in* memória de minha avó Noêmia, que nos deixou saudades, e onde quer que esteja sei que estará sempre torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por não me deixar desistir de meus objetivos nos momentos difíceis e de desanimo, pela forca, benção e principalmente pelo dom da vida.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), instituição na qual, lutamos para fazer parte do seu corpo de alunos, onde tive o privilégio de cursar um curso de pós graduação. Esta que nos ensinou não somente os conteúdos a nível intelectual, mais também a sermos pessoas melhores; lugar em que no convívio do dia-a-dia aprendemos que as dificuldades podem ser superadas com esforço, humildade e dedicação.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado pela atenção e paciência.

À EMBRAPA – Amazônia Oriental, ao pesquisados Dr. Osmar Lameira por ceder as amostras para desenvolvimento de nosso trabalho.

À banca examinadora, Dra. Helena Godoy, Dra. Cláudia Kowalski, Dr. Severino Alencar e Dra. Raquel Grando, pelas contribuições, sugestões e atenção dedicadas ao aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Análise superior e inferior: Carlos, Dani Bio, Dani Ferreira, Dane Pane, Drí, Chico, Cintía, Crís, Jan, Jéssica, Júh "menor", Joyce, Lúh, Gabi 1, Gaby 2, Má, Mí, Naty, Sá, Suelen, Vivis&Batata e o sempre, sempre Seu Dirceu, a todos obrigada pela atenção, carinho, pelos momentos de risadas que pude compartilhar com todos vocês e é claro a imensa ajuda e conhecimentos transmitidos durante todo desenvolvimento deste trabalho. A mamãe do ano mais linda da FEA Jú Pallone, muito mais que uma professora se tornou uma grande amiga. HG pelos seus grandes ensinamentos e pelo enorme coração.

Não podia faltar aqueles amigos que mesmo não estando mais presente no convívio diário do laboratório, também foram fundamentais para a efetivação deste. Minha querida amiga Elede e Merê (foi com elas que tudo começou), a querida Carol, Ciça, Quel, Romina e Stanis. Obrigada pelo carinho, contribuição e auxílio em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos do laboratório de química Renan sempre presente nos meus agradecimentos (uma pessoa, na qual eu devo imensamente), a minha amiga inseparável Fêr e é claro a minha Xará do coração (Poli), que sempre vou guardar como exemplo de PESSOA FELIZ. As minhas amadas amigas de Toxicologia Renatinha querida,

com quem compartilhei minhas melhores risadas, juntamente com a Lú, Raquel (Aline) , Mí, Silvinha e Mazé (conterrânea). A minha amiga Paty da bioquímica pelos momentos em que atuou quase como uma psicóloga (risos).

As queridas técnicas do laboratório de frutas Ana Kon, Bernadete e D. Denir, pessoas mais fofas e umas das primeiras pessoas que conheci ao chegar na FEA. Aos meus grandes amigos de gargalhadas certa e dos almoços de domingo da Engenharia Química: Vinícius, Michelle e Jayver. Aos meus conterrâneos que também foram sempre amigos nas horas difícies: Jhon, Lú, Helô e Wellington. A Gí agora da engenharia de alimentos pela amizade e a Patrícia.

A minha amiga do IEL Luciana, que infelizmente deixou saudades e nosso time desfalcado (SBL). A Thá da fármacia que me ajudou tanto com a química, a Vivian da medicina, minha psicóloga preferida, a Maya da Fono, pelos momentos de loucuras e maiores momentos de risadas.

E por fim minhas amigas de longa data, que mesmo tão longe se fazem tão presente Karlinha, Paulinha, Wall, Beta e Polety. Aminha ex-orientadora, que sempre foi uma das minhas maiores incentivadoras Dr. Rafaela Mattietto, juntamente com o restante do Laboratório de Agroindústria em especial a Sol.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado

Em geral, a todos que aqui não citei, mas que de certa forma colaboraram e estiveram presentes ao longo deste trabalho com os quais vivi momentos maravilhosos durante o decorrer de todo o curso, em fim a todos o meu sincero, MUITO OBRIGADA!!!!!!

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....xi

GENERAL ABSTRACT.....xiii

INTRODUÇÃO GERAL 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....5

CAPÍTULO I: UMA REVISÃO SOBRE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CHÁ: PROPRIEDADES, BENEFÍCIOS E MÉTODOS DE ANÁLISES

1- REVISÃO BIBLIOGÁFICA 8

1.1. Chá: origem e propriedades.....8

1.2. Compostos fenólicos.....10

1.3. Radicais livres e os benefícios do consumo de compostos fenólicos.....16

1.4. Métodos utilizados para análises para análises de compostos fenólicos.....20

1.4.1. Extração.....20

1.4.2. Hidrólise.....22

1.4.3. Métodos químicos e instrumentais.....22

1.4.4. Metodologias para determinação da atividade antioxidantes in vitro.....24

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....26

CAPÍTULO II: COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM INFUSÕES DE ERVAS DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA.

RESUMO.....36

ABSTRACT.....37

1- INTRODUÇÃO.....38

2- MATERIAL E MÉTODOS.....40

2.1. Reagentes e equipamentos.....40

2.2. Amostras.....40

2.2.1. Ervas.....41

2.3. Preparo das infusões.....41

2.4. Avaliação de compostos fenólicos totais.....42

2.5. Determinação de flavonóides totais.....42

2.6. Determinação do potencial antioxidante *in vitro*.....42

2.6.1. Capacidade antioxidante pelo radical livre $DPPH^{\bullet}$.....42

2.6.2. Capacidade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico.....44

2.7. Análise estatística.....45

3- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....45

3.1. Teor de compostos fenólicos e flavonóides totais nas infusões.....45

3.2. Atividade antioxidante.....47

3.2.1. Sequestro do radical $DPPH^{\bullet}$.....47

3.2.2. Sistema β-caroteno/ácido linoléico.....52

4- CONCLUSÃO.....55

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....56

CAPÍTULO III: COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE ERVAS DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA

RESUMO.....61

ABSTRACT.....62

1- INTRODUÇÃO.....63

2- MATERIAL E MÉTODOS.....65

2.1. Padrões e reagentes.....65

2.2. Amostras.....65

2.3. Extração das amostras.....66

2.4. Hidrólise dos compostos fenólicos glicosilados.....66

2.5. Equipamentos e condições cromatográficas.....66

2.6. Metodologia de validação.....67

3- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....68

4- **CONCLUSÃO**.....77

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....78

CONCLUSÃO GERAL.....81

SUGESTÃO.....82

RESUMO GERAL

Nos últimos anos, o consumo de chás aumentou significativamente em função da divulgação dos benefícios à saúde, provenientes da sua ingestão, sendo considerado importante na dieta devido ao elevado potencial antioxidante. No entanto, os estudos sobre o teor de compostos com propriedades antioxidantes encontrados em chás brasileiros são escassos. Devido a estudos que comprovam a presença de fitoquímicos bioativos em chás, este trabalho teve como objetivo avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), flavonóides totais (FT) e a capacidade antioxidante (DPPH• e β-Caroteno/ linoleato) das infusões de 9 ervas provenientes da Região Amazônica: Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita-cavalo (*Luehea speciosa*), Capim-santo (*Cymbopogon citratus*), Erva-cidreira (*Lippia alba*), Graviola (*Annona muricata*), Jucá (*Caesalpinia ferrea*), Pata-de-vaca (*Bauhinia forticata*), Parirí (*Arrabidaea chica*) e Sacaca comum (*Croton spp*). Além disso, os compostos fenólicos presentes nos extratos metanólicos das folhas de três espécies foram separados e quantificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD). A metodologia analítica consistiu de uma extração aquosa (infusão) para análise de compostos fenólicos e flavonóides totais, bem como para as análises de atividade antioxidante. Para análise por CLAE, os compostos fenólicos foram extraídos com metanol, seguida de hidrólise ácida, com o objetivo de liberar as formas agliconas. Com base nos resultados obtidos, em relação aos compostos fenólicos totais, das nove infusões analisadas, três apresentaram os maiores teores: *C. férrea (*721,08 mg EAG/g), *L. speciosa* (540,90 mg EAG/g) e *C. icaco* (497,79 mg EAG/g). Por outro lado, para flavonóides totais, a erva *L. speciosa* e a *L. alba* foram as que apresentaram os maiores teores (12,80 e 15,42 mg EC/g, respectivamente). Para as análise de antioxidantes pelos método citados, o Jucá (*C. férrea*), foi o que obteve o maior resultado. As amostras que apresentaram o maior teor de compostos fenólicos totais, foram posteriormente analisadas por CLAE; Para efeito comparativo, o chá verde comercial *(Camellia sinensis)* também foi analisado por CLAE. Os resultados obtidos da identificação e quantificação foram, em $mg.g^{-1}$ para cada uma das amostras: **Agirú** (ácido gálico 0,45, miricetina 0,78 e quercetina 0,14); **Açoita-cavalo** ((+)- catequina 1,20 e quercetina 0,14); **Jucá** (ácido gálico 0,59 e quercetina 0,13); **Chá-verde** (ácido gálico 0,24, (-)- epicatequina

2,44, (+)- catequina 0,68 e quercetina 0,66). Para as ervas estudadas o Jucá foi o que se destacou, apresentando o maior teor para análise de compostos fenólicos totais e potencial antioxidante para as metodologias aplicadas, o que indica seu possível benefício à saúde o que pode estimular novos estudos sobre a caracterização mais aprofundada sobre seus constituintes.

Palavras-chaves: *Infusão, compostos fenólicos, flavonóides, antioxidante, cromatografia líquida de alta eficiência*

GENERAL ABSTRACT

In recent years, consumption of tea has increased significantly as a result of the health benefits derived from those ingestion. Moreover, tea has been considered important in the diet because of the high antioxidant potential. However, there is a lack of studies on the content of compounds with antioxidant properties found in Brazilian teas. Due to some studies that have proved the presence of these bioactive phytochemicals in tea, this work aimed to evaluate the content of total phenolic compounds (TPC), total flavonoids (TF) and antioxidant capacity (DPPH • and β-carotene / linoleate) of 9 herbs infusions from the Amazon region: Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Aloita-cavalo (*Luehea speciosa*), Capim-santo (*Luehea speciosa*), Herb (*Lippia alba*), Graviola (*Annona muricata*), Juca (*Caesalpinia ferrea*), Pata-de-vaca (*Bauhinia forticata*), Parirí (*Arrabidaea chica*) and common Sacaca (*Croton spp.)* Furthermore, the phenolic compounds present in methanol extracts of the leaves of three species were separated and quantified by liquid chromatography (HPLC) coupled with a diode array detector (DAD). The analytical methodology consisted in aqueous extraction (infusion) for the analysis of phenolics and flavonoids, as well as for the analysis of antioxidant activity. For HPLC analysis, the phenolic compounds were extracted with methanol, followed by acid hydrolysis in order to release the aglycone forms. Based on the results obtained for total phenolic compounds, from the nine infusions assayed, three showed the highest levels: *C. férrea* (669,94 mg GAE/g^{-1}), *C. icaco* (494,13 mg GAE/g^{-1}) and *L. speciosa* (459,23 mg GAE/g^{-1}). On the other hand, for total flavonoids, *L. speciosa* and *L. alba* herbs showed the highest content (12,85 and 15.42 mg CE/g^{-1}, respectively). For the capacity antioxidant analysis by the mentioned methods, Jucá (*C. férrea*) has showed higher values. The samples that exhibited higher levels for total phenolic compounds were analyzed by HPLC: Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita-cavalo (*Luehea speciosa*) and Jucá (*Caesalpinia ferrea*). For comparative purposes, commercial green tea (*Camellia sinensis*) was also analyzed by HPLC. The results for phenolic compounds identification and quantification were, in mg.g^{-1} for each sample: Agirú (0.45 of gallic acid, 0,78 of quercetin and 0,14 of myricetin); Açoita-cavalo (1,20 of (+)-catechin and 0,14 of quercetin), Jucá (0,59 of gallic acid and 0,13 of quercetin), and green tea (0,24 of gallic acid, 2,44 of (-)-epicatechin, 0,68 of (+)–catechin and 0,66 of quercetin). For the herbs studied, Jucá was the most remarkable one, presenting the highest

levels for the total phenolic compounds content and for the antioxidant potential by the applied methodologies, which indicates their potential health benefits that can stimulate new studies on the further characterization of their constituents.

Keywords: *infusion; phenolic compounds; flavonoids; antioxidants; high-performan liquid chromatography.*

INTRODUÇÃO GERAL

Devido a enorme biodiversidade da flora Amazônica e a procura cada vez maior por hábitos alimentares mais saudáveis, o interesse da comunidade científica foi despertado em relação ao potencial de informações ecológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas que a Amazônia possui, além é claro da possibilidade de novas descobertas de produtos biológicos. A região Amazônica possui um grande potencial a ser explorado como fornecedora de biocompostos com elevada atividade antioxidante, em particular os compostos fenólicos, devido a diversos fatores ambientais. Estudos recentes mostram que a Amazônia guarda um total de 33 mil espécies de plantas superiores e dentre estas, cerca de 10 mil são portadoras de princípios ativos (INPA, 2009; OLIVEIRA, 2003).

Levando em consideração o elevado número de espécies vegetais portadoras de compostos bioativos na Região Amazônica, o chá, um importante integrante da dieta, se destaca como uma alternativa para obtenção desses princípios ativos, por ser uma bebida largamente consumida no mundo e por ser referido como uma das melhores fontes de compostos fenólicos existentes (SILVA et al., 2007). Calcula-se que cerca de 30% da população da América do Sul consome, em média, 1 litro de chá por dia (NISHIYMA et al., 2010; SIDIQUI et al., 2004). No Brasil, o consumo desta bebida, ingerida quente ou gelada vem crescendo a cada dia (NISHIYMA et al., 2010).

Enquanto nos países orientais o chá mais consumido é o verde, no Ocidente o mais consumido é o chá preto, embora o consumo do chá verde venha crescendo, devido principalmente à divulgação de suas propriedades funcionais (NISHIYAMA et al., 2010; CHENG, 2006; SAITO et al., 2006).

No Brasil são encontados chás de várias espécies de plantas e apesar do aumento no consumo de infusões de diferentes ervas, a composição da maioria dos chás ainda não é totalmente conhecida. Nas principais cidades brasileiras, já existem uma enorme variedade de chás de alta qualidade e preço elevado, uma vez que a grande maioria provém da exportação, e apesar do alto custo, o consumo vem aumentando a cada dia. Nos últimos cinco anos, a venda de chás no Brasil dobrou e calcula-se que o segmento representa 5% do

mercado de bebidas no país (MORAES-DE-SOUZA, 2007; HIGDON & FREI, 2003; DREOSTI, 2000).

No Brasil, o consumo de chá ainda está relacionado às práticas curativas, tendo suas origens principais nas culturas indígenas, negras e européias (SILVA et al., 2001). Poucos sabem, porém, que o mais consumido no Brasil não é o verdadeiro chá, proveniente da espécie *Camellia sinensis*, mas uma infusão de ervas. O chá é uma bebida que vem sendo amplamente consumida, sendo considerada a segunda bebida mais consumida no mundo depois da água, chegando em torno de 1,5 milhão de xícaras ao dia, boa parte consumidas na porção oriental do globo, o que ganhou atenção da indústria (CHANTRE & LAIRON, 2002).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005), chá é uma bebida preparada através da infusão de folhas, flores ou raízes de plantas. Geralmente é preparada com água quente, e cada variedade adquire um sabor definido de acordo com o processamento utilizado, que pode ser com ou sem fermentação, tostado ou não, podendo ser adicionado de aroma e ou especiaria.

Devido ao interesse mundial crescente por produtos naturais, e sem aditivos, o chá de ervas passou a ser amplamente difundido e divulgado nos restaurantes naturalistas, farmácias, drogarias, supermercados e nos comércios de produtos naturais. O mercado tornou-se competitivo, e cada vez mais vem ganhando espaço no mercado brasileiro, surgindo assim um grande número de fabricantes de ervas e ou misturas de ervas para o preparo de chás, nas formas moídas e em pó solúvel. Por serem ingeridos na forma de infusão, contribuem consideravelmente para o aumento da ingestão de compostos fenólicos (RUIZ-TERÁN et al*.,* 2008; MORAES-DE-SOUZA, 2007; HIGDON & FREI, 2003), compostos estes benéficos à saúde (BUNKOVA et al*.,* 2005; MENDEL & YOUDIM, 2004).

Os compostos fenólicos são considerados um dos grupos de compostos bioativos responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde. Embora existam outros mecanismos, o modo de ação mais citado é a atividade antioxidante pela habilidade de seqüestrar espécies reativas de oxigênio e quelar íons metálicos. O conhecimento do conteúdo de compostos fenólicos presentes nos alimentos a base de vegetais é uma importante ferramenta para o

entendimento do seu papel na saúde humana, bem como para programas que visam o aumento do seu consumo. Acredita-se que a biodisponibilidade e a atividade biológica destes compostos está diretamente relacionada com a sua estrutura química bem como a sua biodistribuição em seres humanos (MONTEIRO et al*.,* 2007; MOLLER & LOFT, 2006).

Desta forma, os compostos fenólicos, presentes naturalmente nas plantas, podem ter efeitos positivos sobre a saúde humana e juntamente com sua atividade biológica, tornam-se importantes componentes na dieta humana (AISLING & O'BRIEN, 2002).

As evidências científicas de que a ingestão de frutas e outros vegetais está associada a efeitos anti-carcinogênicos tem ganhado força e consistência por um painel de peritos (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 1997). Alguns flavonóides têm demonstrado suprimir a carcinogênese em vários modelos animais (YANG et al*.*, 2001). A propriedade antioxidante dos flavonóides foi o primeiro mecanismo de ação estudado, em especial no que diz respeito ao seu efeito protetor contra as doenças cardiovasculares. Os mesmos têm se mostrado eficientes captadores da maioria dos tipos de moléculas oxidantes, incluindo o oxigênio singlete e vários radicais livres, envolvidos em diversas doenças crônico-degenerativas. Dessa forma, o mecanismo de ação antioxidante pode agir suprimindo a formação de espécies reativas de oxigênio, seja por inibição de enzimas ou por quelação oligo-elementos envolvidos na produção de radicais livres, assim como no combate de espécies reativas e/ou aumentando os mecanismos de defesas (MONTORO et al*.,* 2005; BRACA et al*.,* 2003).

Assim, a avaliação dos compostos bioativos em chás e/ou infusões de plantas apresentam uma grande fonte de compostos ainda não identificados estruturalmente e com potencial capacidade antioxidante (HERAS, et al*.,* 1998). Desta forma, a presente investigação representa uma triagem preliminar de nove espécies comumente consumidas em forma de infusão na Região Amazônica.

Sabendo que os compostos fenólicos são metabólitos secundários e estão envolvidos em, praticamente, qualquer interação da planta com o ambiente abiótico (irradiação solar, luz UV, períodos de seca, excesso ou escassez de nutrientes, índices pluviométricos, estações do ano) e poluição, podem ocasionar alterações no metabolismo da planta, modificando a produção destes compostos. Adicionalmente, considerando o fato de que a

Região Amazônica apresenta grandes variações nos mais diferentes fatores abióticos, a presente pesquisa teve como objetivo:

➤ Avaliar 81 extratos aquosos de nove variedades de ervas: Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita-cavalo (*Luehea speciosa*), Capim-santo (*Luehea speciosa*), Erva-cidreira (*Lippia alba*), Graviola (*Annona muricata*), Jucá (*Caesalpinia ferrea*), Pata-de-vaca (*Bauhinia forticata*), Parirí (*Arrabidaea/chica*) e Sacaca comum (*Croton spp*), provenientes da Região Amazônica quanto a presença de compostos fenólicos e flavonóides totais.

➤ Avaliar a capacidade antioxidante nos 81 extratos aquosos, por duas metodologias distintas: sequestro do radical $DPPH^{\bullet}$ e pelo sistema β-Caroteno/ácido linoléico;

➤ Validar e aplicar uma metodologia para separar e quantificar os compostos fenólicos majoritários presentes nos extratos das ervas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

➤ Realizar uma triagem para selecionar três espécies com o maior teor de compostos fenólicos totais para quantificação e identificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

➤ Analisar Estatisticamente os dados obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIOMAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)**. Resolução RDC nº. 267 de 22 de setembro de 2005** – Aprova o regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás.

AISLING, A. S.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism**,** ***Nutrition*****,** v. 18, p. 75–81, 2002

BUNKOVA, R.; MAROVA, I.; NEMEC, M. Antimutagenic Properties of Green Tea. ***Plant Foods for Human Nutrition***, v. 60, p. 25-29, 2005.

BRACA, A.; BILIA, A. R.; MENDEZ,J.; PIZZA, C.; MORELLI. I.; DE TOMMASI, N. Chemical and biological studies on *Licania* genus. In: A.U. Rahman, Editor, ***Studies in natural products chemistry,*** v. 28, p. 35–67, 2003.

CHANDRE, P.; LAIRON, D. Recent findings of green tea extract AR25 (Exolise) and its activity for the treatment of abesity. ***Phytomedicine.*** v. 9, p. 3-8, 2002.

CHENG, T. O. All teas are not created equal: the chinese green tea and cardiovascular health. **International Journal of Cardiology**, v. 108, n. 3, p. 301-308, 2006.

DREOSTI, I.E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. ***Nutrition,*** v.16, n.7/8, p.692-694, 2000.

HERAS, D. L.; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C. BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; GÓMEZ-SERRANILLOS, P.; LISO, P. A.; VILLAR, A. Antiinflamatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. ***Journal of Ethnopharmacology*****.** v.61: p. 161-166, 1998.

HIGDON. J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, v.43, n.1, p.89-143, 2003.

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia, Jan. 2009. Disponível em: <http://projetos.inpa.gov.br/ctpetro/pg_noticias.php?vID=107> Acesso em: 28 Fev. 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: ***Instituto Plantarum***, p, 544, 2002.

MENDEL, S.; YODIM, M. B**.** Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. ***Free Radical Biology and Medicine*****.** v. 37, p. 304-317, 2004.

MOLLER, P.; LOFT, S. Dietary antioxidants and beneficial effects on oxidatively damaged DNA. ***Free Radical Biology & Medicine*** v. 41, p. 388-415, 2006.

MONTEIRO, M.; FARAH, A.; PERRONE, D.; TRUGO, L. C.; DONANGELO, C. Chlorogenic acid compounds from coffe are differentially absorbed metabolized in humans. ***Nutrition.*** v.37, p. 2196-2201, 2007.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, Piracicaba/SP. 2007.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. ª F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo

sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, 30, p. 191-196, 2010.

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C.; Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. ***Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica***. v. 1, p. 49-58, 2003.

RIOS, M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; SABOGAL, C.; MARTINS, J.; SILVA, R. N.; BRITO, R. R.; BRITO, I. M.; BRITO, M. F. C.; SILVA, J. R.; RIBEIRO, R. T. **Benefícios das plantas da capoeira para a comunidade de Benjamin Constant**. Pará, Amazônia brasileira. Belém: *CIFOR*. 2001.

SAITO, T.; MIYATA G. The nutraceutical benefit. Part I: green tea. **Nutrition**, v. 16, n. 5, p. 315-317, 2000.

SIDDIQUI, I.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Antioxidants of the Beverage Tea in Promotion of Human Health. ***Antioxidants & redox signaling***. Mary Ann Liebert, Inc.Vol 6, Number 3, 2004.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. ***Food Chemistry.*** v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H.; MARTINS, M, M. V. M. **Plantas medicinais do Brasil**: aspectos gerais sobre a legislação e comércio. Dez. 2001. Disponível em: <http://www.traficc.org/content/439.pdf> Acesso em 09 set. 2010.

RUIZ-TERÁN, F.; MEDRANO-MARTÍNEZ, A.; NAVARRO-OCAÑA, A. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. ***African Journal of Biotechnology*** v. 7 (12), p. 1886-1893, 2008.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition and the prevention of cancer: A global perspective, 1997. ***Nutrition***, p. 523- 6, 1999.

YANG, J. M. L.; M.; HUANG, M. T.; H.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, ***Annual Review of Nutrition,*** v.21, p. 381–406, 2001.

CAPÍTULO I

UMA REVISÃO SOBRE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CHÁ: PROPRIEDADES, BENEFÍCIOS E MÉTODOS DE ANÁLISE

Pollyane da Silva Port's[1], Osmar Lameira[2], Marcelo Alexandre Prado[1]

[1]Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP, Brasil; [2]Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Amazônia Oriental), CP 48, 66095-100, Belém, PA, Brasil.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Chá: origem e propriedades.

A história do chá como uma bebida data de aproximadamente 2700 a.C. na China, e a tradição foi levada para o Japão no século VI. Por muito tempo, o chá foi consumido apenas pela sociedade privilegiada tornando-se popular somente 700 anos depois. Assim, o consumo de chá difundiu-se da Ásia e das colônias asiáticas para suas metrópoles, de onde em meados do século XVII os ingleses divulgaram e popularizaram a bebida para o mundo (SIDDIQUI et al*.,* 2004; WEISBURGER, 1997).

Historicamente, o consumo de chá no Brasil está relacionado às práticas curativas, tendo suas origens principais nas culturas indígenas, negras e européias (SILVA et al., 2010). No fim do século XX, o consumo da bebida no país cresceu e foi modernizada, surgindo inclusive legislação específica, porém ainda convivendo com o comércio de espécies medicinais em feiras, e o plantio em quintais para o consumo familiar. Esta afirmação pode ser corroborada pela existência, no século atual (século XXI), de pessoas que ainda utilizam os chamados 'remédios caseiros', muitas vezes preparados a partir de plantas regionais. O potencial de utilização farmacológica de vegetais típicos da Amazônia pode ser evidenciado através da balança comercial do estado do Pará, onde foi observado em 2006 que mais de 90% da produção do Estado é referente ao extrativismo vegetal e mineral (em especial). Esses produtos saem sem nenhum tipo de agregação de valor, caracterizando o Estado como fornecedor de matéria-prima (SILVA et al., 2010; RIOS et al., 2001).

O conhecimento da composição bem como a quantidade existente de compostos fenólicos em alimentos, como os chás, é ferramenta importante para o entendimento do seu papel na fisiologia da planta e na saúde humana, bem como para programas que visam o aumento do seu consumo. Fatores econômicos e sociais, também, têm contribuido para o uso de chás de ervas, popularmente conhecidas por seus efeitos curativos (LIMA et al., 2004).

Segundo Moraes-de-Souza (2007), 47 espécies vegetais são utilizadas no Brasil para o preparo de chás, e apesar de a RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005 da Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ressaltar a exclusão das espécies vegetais com finalidade medicamentosa e/ou terapêutica, 23 das 47 espécies são consideradas "plantas medicinais" pelo fato de também serem utilizadas na medicina popular, denominada caseira ou tradicional (LORENZI & MATOS, 2002).

O chá é uma bebida amplamente consumida, principalmente na parte oriental do globo, sendo considerada a segunda bebida mais consumida no mundo depois da água, com consumo em torno de 1,5 milhões de xícaras ao dia, o que despertou a atenção das indústrias. Dentre os chás de maior consumo mundial estão os chás preto e verde. O chá preto é altamente consumido na Europa e nos demais países ocidentais, respondendo por cerca de 78% desse consumo. O chá verde por sua vez detém 20% do mercado, com concentração de consumo no Oriente. O Brasil não tem tradição de consumo de chás, mas registra-se um destacado crescimento na participação no mercado de bebidas (MORAES-DE-SOUZA, 2007; SIDDIQUI, 2004; CHANTRE & LAIRON, 2002).

Poucos sabem, porém, que o chá mais consumido no Brasil não é o verdadeiro chá (*Camellia sinensis*), e sim infusões de ervas. Devido o interesse mundial crescente por produtos naturais, e sem aditivos, o chá de ervas passou a ser amplamente difundido e divulgado nos restaurantes naturalistas, farmácias, drogarias, supermercados e nos comércios de produtos naturais. O setor tornou-se competitivo, e cada vez mais vem ganhando espaço no mercado brasileiro, surgindo assim um grande número de fabricantes de ervas e ou misturas de ervas para o preparo de chás, nas formas rasuradas, moídas e em pó solúvel. Por serem ingeridos na forma de infusão, contribuem consideravelmente para o aumento da ingestão de compostos fenólicos (VENDITTI et al*,* 2010; HIGDON & FREI, 2003; MCKAY & BLUMBERG, 2001), compostos estes benéficos à saúde (BUNKOVA et al*.,* 2005; MENDEL & YOUDIM, 2004).

Assim, o chá é consumido em todo o mundo, por diferentes razões, o que o tornou alvo de estudos e publicações científicas, que mostram os potenciais benefícios à saúde. A importância desses estudos é justificada pelo fato de que, alimentos que contêm compostos fenólicos, normalmente, apresentam alta atividade antioxidante, podendo ter efeitos positivos tanto na conservação da qualidade dos alimentos, quanto na preservação da saúde humana. Quando presentes regularmente na dieta, podem ser associados à diminuição do

risco de doenças crônicas, principalmente câncer e doenças cardiovasculares. Tais doenças, freqüentemente correlacionadas ao alto consumo de alimentos ricos em colesterol e gorduras saturadas, e ao baixo consumo de fibras dietéticas e principalmente de biocompostos com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos, fizeram com que a procura por esses antioxidantes naturais aumentasse significativamente nesta última década (BECKER et al, 2004; LEE et al., 2004; SIDDIQUI et al*.,* 2004).

1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários presente nas plantas e são amplamente distribuídos no reino vegetal. Englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização, e podem estar presentes na forma livre, ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas em diversas partes das plantas (comestíveis e não comestíveis), como nas sementes, frutos, folhas, casca do caule e também na raiz. Atualmente são conhecidas mais de 8.000 estruturas, cujas origens orgânicas são ligadas ao caminho metabólico do ácido shiquimico e ao metabolismo dos fenil propanóides (SALDANHA, 2005; ANTOLOVICH et al*.,* 2000; DREOSTI, 2000).

Em sua estrutura básica, possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Tais substâncias ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos (MANACH et al*.,* 2004). A importância dos compostos fenólicos está diretamente relacionada com a atividade fisiológica, a habilidade de capturar espécies reativas de oxigênio, quelar íons metálicos, inibir a nitrosação, inibir o potencial de auto-oxidação e a apresentam a capacidade de modular certas enzimas celulares ativas (ANTOLOVICH et al., 2000).

Pesquisas recentes indicam uma grande variação na produção de metabólitos secundários pelas plantas, isto é, plantas pertencentes a mesma espécie podem ao longo dos anos sofrer variações quanto a sua constituição genética e atividade fisiológica, condicionadas pelo processo de seleção ambiental. Esta diversidade genética ocorre devido ao processo metabólico de cada organismo (HERAS, 1998).

Essas interferências ambientais são os principais precursores no estímulo para produção desses metabólitos. A concentração desses componentes químicos nas plantas dependerá do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio. Os genes biossintéticos podem ser ativados para estimular a superprodução de substâncias defensivas, como em casos por exemplo, de agressão por microrganismos e/ou pragas, solo pobre em nutrientes, clima, ferimentos, exposição à luz UV, etc. Dentre estas substâncias encontram-se os compostos fenólicos, que também podem atuar nas plantas como antimicrobianos, fotorreceptores, atrativos visuais e repelentes de predadores (NICHENAMETLA et al*.,* 2006; PIETTA, 2000).

Em geral os compostos fenólicos costumam ser classificados nas seguintes categorias: 1) fenóis, ácidos fenólicos e ácidos fenilacéticos; 2) ácidos cinâmicos, cumarinas, isocumarinas e cromonas; 3) lignanas; 4) dez grupos de flavonóides; 5) ligninas; 6) taninos; 7) benzofenonas, xantonas e estilbenos; 8) quinonas; 9) betacianinas (CARRASCO-PANCORBO et al*.,* 2005).

Os flavonóides, junto com os isoprenóides e alcalóides, compreendem as três maiores classes de produtos secundários produzidos pelas plantas superiores. Na maioria das espécies de plantas, o excesso de luz e alta radiação UV entre outros fatores, desencadeiam um aumento na síntese e acúmulo de compostos não fotossintéticos relacionados a via dos fenil propanóides contendo o esqueleto C_6-C_3 (fenil propano), derivados do ácido cinâmico, sintetizado do ácido shiquímico (DIXON, 2002).

Os flavonóides são sintetizados pela combinação das vias metabólicas do ácido shiquímico e da acetil-CoA carboxilase (**Figura 1**).

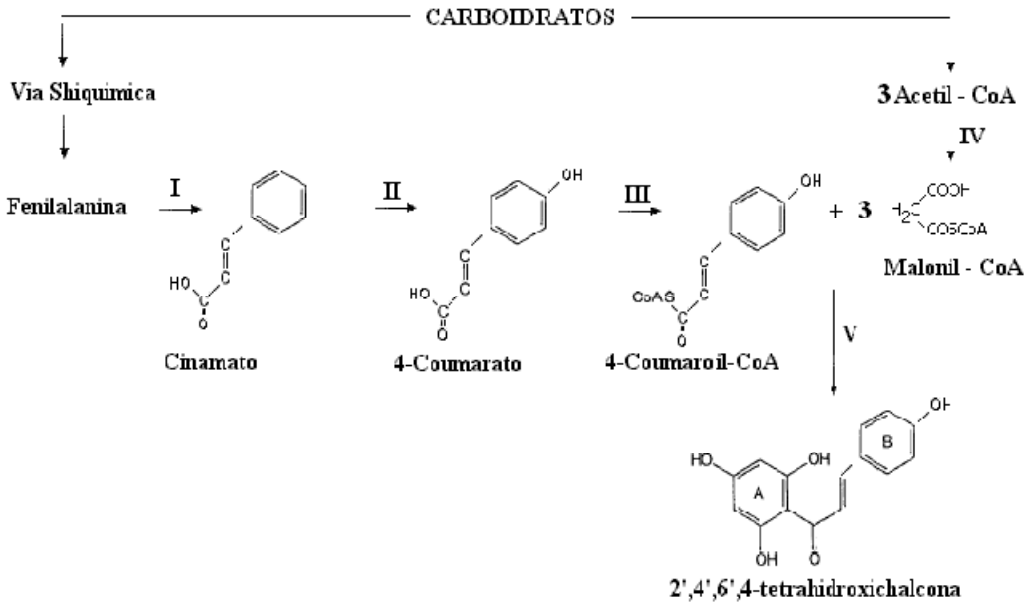

Figura 1: Esquema ilustrando as etapas da biossíntese para formação da chalcona intermediária básica C_{15}, da qual todos flavonóides são formados.

Em resumo os flavonóides apresentam uma estrutura muito semelhante entre si, possuem estrututa básica formada por C6-C3-C6 (**Figura 2**), sendo que a diferença entre eles está nos grupamentos ligantes dos anéis e a presença, ou não, de ligações duplas. Podem ser encontrados na forma aglicosilada, como, por exemplo, a quercetina, naringenina ou ainda miricetina, porém é mais frequente encontrá-las no reino vegetal na forma glicosilada, unidas a moléculas de açúcares como a ramnose, rutinose (03 moléculas de glicose) ou ainda é possível misturas de glicosídeos, como a rhamnose-glucosídeos, formando respectivamente os derivados flavonóides glicosilados (SPANOS & WROLSTAD, 1992). Assim, os flavonóides podem ser divididos em diversas classes, entre elas, destacam-se: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (YANEZ, et al., 2007; ARRABI, et al*.,* 2004). Algumas dessas diferenças estruturais podem definir o potencial antioxidante destes compostos (SOARES, 2002).

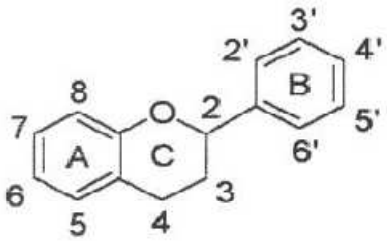

Figura 2. Estrutura geral dos flavonóides

Quanto ao seu modo de ação, os grupos OH do anel B podem doar um hidrogênio e um elétron aos radicais hidroxila, peroxila e peroxinitrito, estabilizando-os e transformando o flavonóide em uma molécula radical relativamente estável. Também são capazes de quelar metais, formando complexos que ainda assim mantém a atividade antioxidante. (HEIM et al*.,* 2002). Faz-se importante ressaltar que a glicosilação dos compostos fenólicos resulta em menor atividade antioxidante do que aquela apresentada pela aglicona correspondente (CHOE & MIN, 2009; HEIM, et al., 2002).

Apesar de vários estudos realizados sobre a ingestão de flavonóides na dieta e os seus possíveis benefícios à saúde humana, o número de estudos ainda são poucos e considerados inconsistentes ou insuficientes para comprovar definitivamente esta ação, principalmente no que diz respeito a biodisponibilidade desses compostos. Evidências sobre a absorção desses compostos que ultrapassam a barreira do intestino são observadas pelo aumento da atividade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). Segundo Hassimotto *et al.* (2005), a ingestão diária na Holanda está estimada em 23 mg por dia, sendo que 48% proveniente do chá, seguido pelo alho (29%) e pela maçã (7%). No Japão, a ingestão de flavonóis e flavonas foi estimada em 16,7 mg por dia para mulheres (46% proveniente do alho), e 42,2 mg por dia de isoflavonas (37% vindo do tofu). Na Europa, o consumo de flavonóides provenientes de chás e vinhos pode variar de 50 a 800 mg diários. O consumo no Brasil está estimado em 70,5 mg diárias para mulheres, sendo que 68% são provenientes da laranja, 12% de vegetais, e 2,5% do tomate.

Assim, o isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos representam importância fundamental para o desenvolvimento científico da própria química de produtos naturais e contribuem para avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país. A diversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais isoladas de plantas da flora brasileira recebeu atenção especial de pesquisadores envolvidos em tais pesquisas no território nacional devido ao potencial relevante deste arsenal químico para o desenvolvimento social e econômico e a correspondente contribuição da química de produtos naturais para o avanço científico e tecnológico (BRAZ-FILHO, 2010; LEMOS et al*.,* 2007).

Asolini et al. (2006), avaliaram os compostos fenólicos presentes em dez espécies vegetais e encontrou altas concentrações de compostos fenólicos tanto para os extratos aquosos (18 a 145 mg EAG/g), como para os extratos etanólicos (25 a 56 mg EAG/g). Para as análises de atividade antioxidante, os resultados foram superiores a 84% para os extratos etanólicos, enquanto para os extratos aquosos algumas espécies apresentaram atividade antioxidante maior que 97%.

Cai et al. (2003), obtiveram em seu trabalho com 112 espécies tradicionais da China, uma variação da quantidade de compostos fenólicos em extrato aquoso de 0,19 a 50,2 g GAE/100g em peso seco e para os extratos metanólicos uma variação de 0,22 a 50,3 g GAE/100g. Dentre os principais tipos de compostos fenólicos encontrados nas 112 espécies estudadas, foram encontrados os ácidos vanílico, gálico, clorogênico, cafeico, cinâmico, p-coumárico, ferrúlico, elágico e *p*-hidroxybenzóico, além dos flavonóides kaempferol, quercetina, rutina, catequina, isoquercetina, epicatequina, epigalocateqina e taninos

Pesquisas realizadas por Aruoma (2003), mostraram que a graviola (*Annona muricata*), possui com relação ao seu conteúdo de fenólico total, na concentração de 1,0 mg/mL de extrato metanólico, 0,143 mg/mL de compostos fenólicos, o que representa cerca de 14%.

Tanaka & Silva (2005), isolaram nas folhas de *Luehea speciosa* (açoita cavalo), alguns compostos como vitexina, ácido maslínico e glicopiranosilsitostero, sendo encontrado quantidade considerável do flavonóide (-)-epicatequina nos extratos metanólicos.

A espécie *Cymbopogon citratus* (capim-santo, capim-limão e capim-cidreira) possui em suas folhas o óleo essencial, que contém em maior quantidade substâncias do grupo monoterpenos: citral 65-80%. Segundo Cheel et al. (2005), encontrou-se para infusões desta espécie, resultados de forte atividade antioxidante, tanto para o $DPPH^{\bullet}$ bem como para inibição da peroxidação lipídica. Os compostos encontrados em maior quantidade para dada espécie foram ácidos caféico e clorogênico obtendo um IC_{50} de 68,8 e 54,2 mM, respectivamente, um efeito forte para DPPH. O ácido cafeico inibiu a peroxidação lipídica em 85% a 100 □g/mL. Para Silva et al. (2010), outros metabólitos secundários também estão presentes como: limoneno, eugenol, luteolina, os ácidos clorogênicos, cafeico e *p*-cumárico e mentol.

Arrabidaea chica (HBK) Verlot, Bignoniaceae, é um arbusto que ocorre na América tropical, mais concretamente na bacia amazônica, onde é chamado "Pariri", "Crajiru", "Carajuru" ou "Carajiru (BARBOSA et al*.,* 2008). Atualmente é amplamente utilizado como infusão. Estudos recentes mostram que o conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides presentes nas folhas é de 10,2 mgEAG/g e 0,06 mgEC/g, respectivamente, no entanto, muito pouco se conhece sobre a constituição química de suas folhas (SILVA et al*.,* 2007). Para a espécie *Bauhinia forficata,* conhecida pelo nome popular "pata de vaca", encontrou-se para análise de fenólicos totais um total de 16.6 mg EAG/g (SILVA et al*.,* 2007). Sobrinho et al. (2008), obtiveram resultados para flavonóides em teor de matéria seca valores em torno de 3,64% p/p.

A espécie *Caesalpinia ferrea* Mart*.,* conhecida popularmente como "jucá" ou "pau-de-ferro" foi estudada por Araújo et al. (2008), que encontraram para análise de flavonóides totais em equivalente de rutina um resultado de 2,34 mg/g,

O extrato aquoso das folhas de Agirú - *Chrysobalanus icaco L.*, que é comumente usado no norte do Brasil (estado do Pará), apontam a espécie como fonte de miricetina-3-*O*glucuronídeo (miricitrina) e quercitrina, entre outros minoritários derivados de miricetina (BARBOSA et al*.,* 2006).

A erva-cidreira (*Lippia alba*), segundo Lima et al. (2004), obteve teor de compostos fenólicos, de 16,29 mg/g após 10 minutos de infusão. Os compostos encontrados em maior concentração foram o kaempferol, quercetina e miricetina.

Em relação a algumas das espécies que foram estudadas neste trabalho, não foram encontrados estudos ou trabalhos científicos relacionados especificamente as infusões das ervas analisadas.

1.3. Radicais livres e os benefícios do consumo de compostos fenólicos

Muitos trabalhos relatam a funcionalidade dos compostos fenólicos como um todo, porém atualmente, mais do que saber se um alimento contém compostos fenólicos, é importante conhecer a composição e quais as quantidades presentes em cada alimento.

As recentes descobertas sobre os mecanismos de oxidação que ocorrem nas células, responsáveis por uma série de condições patológicas, como aterosclerose, cancêr e diabetes, estimularam o aparecimento de um grande número de pesquisas sobre a ação de substâncias antioxidantes capazes de agir como seqüestradoras de espécies oxidantes geradas nos organismos vivos. Produtos naturais, como os condimentos, contendo compostos fenólicos têm sido objeto dessas pesquisas (MANCINI-FILHO & MOREIRA, 2003; SOARES, 2002; THOMAS, 2000).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres, que são moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres (não pareados) em sua órbita externa. Os elétrons livres dessas moléculas as tornam quimicamente instáveis, bastante reativas (MELO & GUERRA, 2002; CHEESEMAN & SLATER, 1996), e podem ter origem endógena como exógena. As fontes endógenas e exógenas segundo Cavalcante & Bruin (2009), podem ser várias, tais como:

1. A cadeia respiratória cuja redução monovalente de uma molécula de oxigênio dá lugar a distintas espécies reativas oxidantes, como o oxigênio singlete ($^1O_2$), o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2);
2. As células fagocitárias (monócitis, neutrófilos e macrófagos) que utilizam o sistema de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P (NADPH) oxidase para gerar diretamente o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Por outro lado, estas células também sintetizam óxido de nítrico ($^{\bullet}NO$) como mecanismo de defesa, que por

sua vez, reage com o ânion superóxido para gerar o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), capaz de induzir a peroxidação lipídica em lipoproteínas;

3. A autoxidação de compostos de carbono reduzido, como aminoácidos, proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucléicos;
4. A ativação catalítica de diversas enzimas do metabolismo intermediário como a hipoxantina e xantina oxidase, aldeído oxidase, monoamino-oxidase, ciclooxigenase ou lipoxigenase.

As fontes exógenas de ROS e RNS (espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio) podem ser a exposição a certas radiações (eletromagnéticas, luz solar, ozônio), componentes dos cigarros, certos aditivos alimentícios, entre outros (Choe & Min, 2006). O excesso de espécies reativas no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta.

Em vista dos prejuízos provenientes do excesso de ROS e RNS, as células dispõem de uma variedade de mecanismos de defesa contra os danos causados por estas espécies: as defesas antioxidantes. Para o funcionamento celular normal, deve haver uma compensação entre a formação de ROS/RNS e os níveis de defesas antioxidantes, que mantêm a célula em estado geral reduzido. Se as defesas antioxidantes tornam-se insuficientes frente à excessiva produção de ROS e RNS, ocorre o chamado estresse oxidativo. Estresse oxidativo agudo bem como estresse oxidativo crônico têm sido relacionados a um grande número de doenças degenerativas, como cancêr, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (JUNG et al*.,* 2006; JACOB & BURRI, 1996), possívelmente por desestabilização das membranas (MORA et al*.,* 1990), dano no DNA (ácido desoxirribonucleico) (TAKABE et al*.,* 2001), e oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). De acordo com Ramarath et al. (1995), a autoxidação dos ácidos graxos insaturados que compõe a membrana celular, é apontada como o processo oxidativo de maior ocorrência no organismo humano.

Considerando-se que a produção de ROS/RNS e as defesas antioxidantes estejam em ajuste contínuo, pode-se supor que em algumas situações o balanço pode tender facilmente em favor das espécies reativas. O estresse oxidativo poderia ocorrer em várias situações patológicas ou ambientais que aumentem a produção de ROS/RNS e em conseqüência do

consumo inadequado de antioxidantes derivados da dieta (DEMMIG-ADAMS & ADAMS, 2002).

Espécies reativas de nitrogênio parecem contribuir para patologias cardiovasculares. O peroxinitrito, um potente oxidante gerado pela reação do óxido nítrico com ânion superóxido no endotélio vascular, induz a oxidação do LDL (LEEUWENBURGH et al*.,* 1997) e a disfunção pró-inflamátória do miocárdio mediada por citoquinina (WANG et al*.,* 2002; FERDINANDY et al*.,* 2000). A nitrotirosina, um produto da nitração de proteínas por espécies reativas de nitrogênio, está presente em lesões ateroscleróticas humanas (BECKMANN et al*.,* 1994). Devido a isso, a significância dos antioxidantes na dieta e o seu suposto papel na intervenção e profilaxia de doenças cardiovasculares têm sido de interesse considerável. (HEIM et al*.,* 2002).

Estudos revelam que estes compostos, presentes nos alimentos, estão associados com ações anticarcinogênicas (inibição do câncer de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele), anti-inflamatórias, anti-hepatóxica, antiviral, antialérgica e antitrombótica (MAZZA & GIRARD, 1998), além de prevenir oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), diminuindo os riscos da aterosclerose, atuando na prevenção de doenças cardiovasculares e na absorção de produtos tóxicos oriundos da peroxidação lipídica (GORELIG et al*.,* 2008; MATSUMOTO et al*.,* 2003; DUBICK & OMAYE, 2001). Ações antibacteriana (ASOLINI et al*.,* 2006; FALCÃO et al*.,* 2001; NIJVELDT et al*.,* 2001; CHANARAT et al*.,* 1997), antifúngica, anti-inflamatória, antitumoral (HO et al*.,* 2002) também já foram relatadas.

Um grande número de pesquisas demonstram atividades biológicas relacionadas à composição de compostos fenólicos e flavonóides, bem como a determinação da atividade antioxidante de espécies vegetais que são utilizadas para o preparo de infusões de ervas (GRAMZA & KORCZAK, 2008; ATOUI et al*.,* 2005). Entretanto, vários destes estudos utilizam diferentes solventes na extração destes compostos e, como conseqüência pouco se sabe ainda sobre o potencial antioxidante de infusões sobre a saúde humana (KATALINIC et al*.,* 2006; ATOUI et al*.,* 2005; TRIANTAPHYLLOU et al*.,* 2001).

Em virtude do crescente interesse nos efeitos benéficos dos chás, foram publicados na China aproximadamente 700 trabalhos de chás em quase 300 revistas, em cerca de duas décadas. Dentre os estudos recentes sobre a avaliação da atividade antioxidante, bem como

os compostos fenólicos bioativos, destacam-se as infusões de chá verde (*Camellia sinensis*), chá preto (*Camellia sinensis*), hortelã (*Mentha sylvestris*), camomila (*Matricaria chamomilla*), erva-cidreira (*Hedyosmum brasiliense martius*), mate (*Ilex paraguariensis*), funcho (*Foeniculum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Esses trabalhos demonstram a grande importância de se analisar a composição fenólica e atividade antioxidante na forma como a infusão é obtida, diferentemente dos estudos realizados no passado, onde os compostos químicos eram extraídos até a exaustão com o uso de solventes orgânicos (AOSHIMA et al., 2007; KATALINIC et al., 2006; ATOUI et al., 2005; IVANOVA et al., 2005).

Plantas (frutas, legumes, ervas medicinais, etc.) são fontes de compostos bioativos com atividade antioxidante e podem conter uma grande variedade de moléculas capazes de seqüestrar radicais livres, dentre estes estão os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas, lignanas, estilbenos, taninos), alguns compostos nitrogenados (alcalóides, aminas, betalaínas), vitaminas, terpenóides (incluindo carotenóides), e alguns outros metabolitos endógenos (CAI et al., 2003; ZHENG & WANG, 2001; VELIOGLU et al., 1998; COTELLE et al., 1996). Estudos epidemiológicos têm mostrado que muitos destes compostos antioxidantes atuam como anti-inflamatórios, antiateroscleróticos, antitumorais, antimutagênicos, anticarcinogênicos, antibacterianos ou antivirais (SALA et al., 2002; OWEN et al., 2000). A ingestão de antioxidantes naturais tem sido associado com menor risco de doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças associadas ao envelhecimento (SUN et al., 2002; YANG et al., 2001; KUO, 1997; MCLARTY, 1997; HERTOG et al., 1995).

É importante salientar que apenas a identificação e a quantificação destes compostos não são parâmetros suficientes para avaliar o quanto um alimento ou composto é benéfico à saúde. Cabe ressaltar que a análise de compostos isolados também não é suficiente na verificação do potencial antioxidante de um alimento, uma vez que tais compostos nunca estão sozinhos e pode haver reações sinérgicas ou antagônicas entre eles. Assim, a verificação destas interações também é importante, bem como a verificação da capacidade antioxidante do alimento como um todo (IACOPINI et al., 2008).

Para que os benefícios do consumo do chá sejam máximos, são necessários estudos que assegurem as melhores formas de preparo da bebida, garantindo maior extração e estabilidade dos compostos bioativos (NISHIYAMA et al*.,* 2010).

1.4. Métodos utilizados para análises de compostos fenólicos

A determinação dos níveis de compostos fenólicos totais em tecidos vegetais é a etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade fisiológica. A capacidade redutora desses compostos pode ser uma das propriedades utilizadas para nortear a quantificação inicial, porém, em tecidos vegetais, a presença de carboidratos e outros interferentes com as mesmas característica requer metodologias confiáveis para tais avaliações (ANTOLOVICH et al., 2000).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando uma série de dificuldades, devido a diversidade de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumárinas, flavonóides, taninos e ligninas), a grande polaridade e reatividade, e a susceptibilidade à ação de enzimas (SOARES, 2002).

1.4.1. Extração

A extração é uma das etapas mais importantes no processo da análise como um todo, e vários métodos são referidos na literatura para extração desses compostos. As técnicas mais utilizadas na literatura são a extração líquido-líquido (LLE) ou extração sólido-líquido (SLE), para o caso de matrizes sólidas, e a extração em fase sólida (SPE). A extração mais empregada para compostos fenólicos em ervas é a aquosa, e se dá por infusão das folhas, sendo variáveis desta etapa a temperatura e o tempo de infusão. A temperatura mais comumente utilizada em extração aquosa é de 98 ± 2 ºC, através da infusão ou fervura por alguns minutos (LIMA et al*.,* 2004; TURA & ROBARDS, 2002). No entanto quando o objetivo do trabalho é a avaliação quantitativa do teor dos compostos fenólicos nas folhas e não nos chás como consumidos pelo homem, os solventes de extração são os orgânicos e

não a água (MATSUBARA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). A **Tabela 1** mostra várias metodologias utilizadas para extração de compostos fenólicos em vegetais.

Tabela 1. Técnicas de extração de compostos fenólicos.

Solução extratora	Tempo de extração	Temperatura de extração	Outras informações	Referência
Etanol	6h	-	Soxleht seguido por purificação em coluna cromatográfica de sílica e carvão ativado (1:0,5)	FURLONG et al., 2003
Etanol e água (50%)	2h	45 °C	Sem agitação, filtração e concentração em rota evaporador	POMPEU et al., 2009
Metanol	-	ambiente	Agitação magnética partição com hexano e clarificação com hidróxido de bário e sulfato de zinco	FURLONG et al., 2003
Acetona e água (50%, 75% e 100%)	overnight	4-10 °C	-	YILMAZ & TOLEDO 2006
Metanol, água e ác. Acético (80:19,5: 0,5)	30min	4 °C	Centrifugação	ANDRÉ et al., 2009
Éter etílico	1h	Ambiente	Agitação magnética e filtração a vácuo	BROINIZI et al., 2007
Metanol 100%	12h	Ambiente	Agitação magnética	AO et al., 2007
Etanol e água (50%)	2h	50 °C	Sem agitação, no escuro, foi filtrada concentrada em rota evaporador.	POMPEU et al., 2007
Água	1h	80 °C	Agitação em banho-maria	TAWAHA et al., 2007
Metanol 80%	3h	37 °C	agitação	TAWAHA et al., 2007

1.4.2. Hidrólise

A determinação quantitativa de flavonóides glicosilados em materiais vegetais se torna bastante difícil, devido ao seu grande número. Portanto, os glicosídeos são normalmente hidrolisados nas agliconas correspondentes, e que podem a partir de então serem identificadas e quantificadas.

Métodos para a hidrólise ácida de flavonóides a partir de vegetais e frutos foram publicadas por Hertog et al. (1992b), e por Hakkinen, et al. (1998). Normalmente, a hidrólise de glicosídeos flavonóides exige concentrações relativamente elevadas (1-2 mol/L^{-1}) de minerais ácidos em condições de refluxo. Todavia, as condições para realização da hidrólise desses glicosídeos podem ser rigorosas para alguns dos compostos presentes na planta, como as catequinas, por exemplo, são miricetinas degradadas parcialmente (MERKEN & BEECHER, 2000; HAKKINEN et al*.,* 1998; HERTOG et al*.,* 1992).

Dessa forma, estudos devem ser realizados e avaliados de acordo com cada matéria-prima empregada, a fim de desenvolver os melhores procedimentos e condições de preparação e hidrólise das amostras para a formação de agliconas de flavonóides, sem degradar as agliconas (NUUTILA et al*.,* 2002).

1.4.3. Métodos químicos e instrumentais

As análises de compostos fenólicos totais pode ser realizada por métodos colorimétricos e enzimáticos. No entanto, grande parte dos trabalhos determina o teor de fenólicos em chás por métodos colorimétricos com o reagente Folin-Ciocalteu. Utilizando o ácido gálico como padrão de referência, o método baseia-se em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolíbdico no reagente para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente a 760 nm. O preparo do reagente de Folin-Denis é bastante simples e este é o método mais comumente utilizado para doseamento de fenóis totais. Os resultados são expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de peso seco (mg EAG/g) (ASSOLINI et al*.,* 2006; SINGLETON et al*.,* 1999)

Vários métodos são utilizados para a determinação dos compostos fenólicos majoritários em produtos naturais, no entanto, é de significativa importância que sejam

desenvolvidos métodos capazes de determinar, simultaneamente, uma grande gama de compostos, com rapidez, custos relativamente baixos e com resultados de qualidade (AGOSTINI E GODOY, 1997). Seguindo esse objetivo, diversos procedimentos já foram otimizados para identificar e quantificar flavonóides em alimentos, incluindo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG), Eletroforese Capilar (EC) e Eletrocromatografia Capilar (CEC) (MOLNÁR-PERL E FÜZFAI, 2005). Essas técnicas são de extrema importância na separação, na identificação e na quantificação dos polifenólicos (STALIKAS, 2007).

Entre as técnicas cromatográficas para determinação de constituintes fenólicos biologicamente ativos, a mais utilizada com essa finalidade é o método por CLAE em fase reversa com eluição por gradiente. Quanto a identificação dos compostos, é muito comum utilizar a detecção por espectrofotometria de absorção na região UV-visível. Neste caso, a identificação é feita por comparação dos tempos de retenção e dos perfis de espectros de absorção obtidos de padrões isolados. No entanto, a forma mais conclusiva de identificação é a utilização de técnicas, como a espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (BUIARELLI et al., 1995; KOO et al*.,* 2000; LOPEZ et al*.*, 2001). Normalmente, os flavonóides são os de maior ocorrência em folhas, frutos e outras partes aéreas de vegetais, dentre alguns estão a quercetina, kaempferol e miricetina (KALLITHRAKA et al*.,* 2001; SCHIEBER et al*.,* 2001; HÄKKINEN et al*.,* 1999; PEREZ-MAGARIÑO et al*.,* 1999).

A cromatografia em fase reversa é o modo mais popular em CLAE para compostos fenólicos. As colunas podem variar de 100 a 300 mm de comprimento e geralmente com um diâmetro de 4,6 milímetros interno. As colunas mais utilizadas são as colunas C_{18}, os sistemas de eluição são geralmente binário com uma solução aquosa ácida, solvente polar, como o ácido acético, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido fórmico ou ácido orto-fosfórico (solvente A) e um solvente orgânico polar como o metanol ou acetonitrila (solvente B) (FRANCISCO & RESURRECCION, 2009).

A faixa de pH da fase móvel mais frequentemente utilizadas na CLAE para compostos fenólicos é baixa, entre 2 e 4. A corrida geralmente tem a duração de uma hora

no máximo, com equilíbrio entre as injeções (FRANCISCO & RESURRECCION, 2009; MERKEN & BEECHER, 2000).

1.4.4. Metodologias para a determinação da atividade antioxidante in vitro.

O crescente interesse pelos possíveis benefícios dos antioxidantes à saúde tem feito com que seja desenvolvida uma grande quantidade de métodos para determinar a atividade antioxidante dos extratos de alimentos. Com este objetivo foi planejada uma série de condições que deveria reunir um procedimento padrão de medida da atividade antioxidante *in vitro,* tais como: avaliar reações de transferência de elétrons e átomos de hidrogênios; medir reações químicas que de fato ocorram em reações potenciais, ou seja, assegurar que o substrato e o modo de induzir a oxidação sejam relevantes como fontes de danos oxidativos; ser um método simples e possuir um mecanismo e ponto final definido; ter uma boa reprodutibilidade; estar adaptado para o uso rotineiro de análises em grande escala; estar adaptado a medir antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos; utilizar diferentes fontes de radicais e possuir uma instrumentação que seja disponível (PRIOR et al*.,* 2005).

No entanto, não há conhecimento de um método até a atualidade que reúna todas essas características e talvez seja quase impossível que se possa avaliar a atividade antioxidante de uma amostra por um método apenas ao invés da combinação de vários como é feito hoje. Isto ocorre devido os antioxidantes poderem exercer sua ação mediante diferentes mecanismos. Além disso, em um mesmo alimento pode haver misturas de diferentes antioxidantes com variados mecanismos de ação, ocorrendo reações sinérgicas e por isso, faz-se necessário a diversificação das análises para poder considerar os possíveis mecanismos de ação dos antioxidantes presentes (PRIOR et al*.,* 2005; FRANKEL & MEYER, 2000).

Outro aspecto importante a ser considerado na determinação da atividade antioxidante *in vitro* é que devido às multiplas modificações feitas em cada um dos métodos existentes, muitas vezes a comparação entre os resultados, ainda que correspondendo ao método de medida, deve ser efetuada com precaução. Isto é necessário, já que pode ter existido mudanças na manipulação, na temperatura do ensaio, na variedade

da amostra ou em suas condições de processamento, no modo de combinar as amostras com os reagentes (por exemplo: tempo de exposição dos compostos ativos aos reagentes, etc), na metodologia empregada na extração (modo de agitação da amostra, solvente, etc) (MUKHOPADHY et al*.,* 2006; BOMPADRE et al*.,* 2004). Na literatura, os resultados para um mesmo método são expressos de diversas formas dificultando assim a comparação dos resultados (VILLAÑO et al*.,* 2005).

Quanto à capacidade antioxidante está pode ser determinada por diversos métodos espectrofotométricos *in vitro*. Dentre eles, alguns são baseados na captura de radicais livres (ORAC, ABTS, DPPH), outros no poder de redução do metal ferro (FRAP) ou na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL) (PAIXÃO et al*.,* 2007).

É importante selecionar e aplicar um método estável e rápido ao ensaio de atividade antioxidante, já que a determinação de grande quantidades de amostras é demorado. O método mais comum envolve a determinação do desaparecimento de radicais livres utilizando um espectrofotômetro, tais como 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) radical ácido ($ABTS^{\bullet}$) e 1,1-difenil-2- picrilhidrazil radical ($DPPH^{\bullet}$) (ANTOLOVICH et al*.,* 2002).

Dessa forma à atividade antioxidante de chás pode ser avaliada de maneira eficiente pelo método do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) criado por Brand-Williams et al. (1995), entretanto, modificado e melhorado nos últimos anos. É um dos mais utilizados entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade de um composto em capturar radicais livres, por ser considerado prático, rápido e estável (IACOPINI et al*.,* 2008; CAI et al*.,* 2004; ESPIN et al*.,* 2000). Este método consiste na redução do radical DPPH•, quando este entra em contato com um composto capaz de doar um elétron ou átomo de hidrogênio, alterando a cor da solução metanólica de DPPH• de violeta para amarelo, de acordo com a reação expressa na **Figura 3** (MILARDOVIĆ et al*.,* 2006). A adição do antioxidante resulta em um decréscimo na absorbância proporcional a concentração e atividade antioxidante do composto (PAIXÃO et al*.,* 2007).

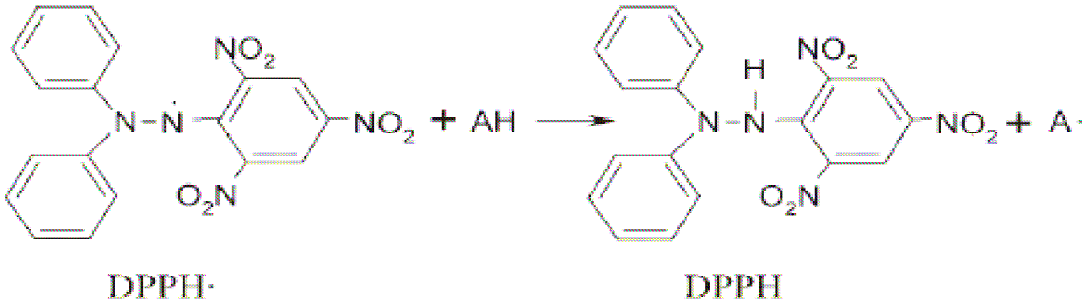

Figura 3. Mecanismo de reação do DPPH•

Para o sistema β-caroteno/ácido linoléico, a avaliação está relacionada a atividade de inibição dos radicais livres que são gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β-Caroteno induzido pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. A determinação é efetuada a 470 nm, na presença e na ausência de antioxidante.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, T.S. & GODOY, H.T. Simultaneous determination of nicotinic acid, nicotinamide, riboflavin, thiamin and pyridoxine in enriched Brazilian foods, by HPLC. ***Journal High resolution Chromatography***, 20, 3081-3086, 1997.

ANDRÉ, C. M.; OUFIR, M.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J.; ROGEZ, H.; Larondelle, y.; evers, d. influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). ***Journal of Food Composition and Analysis.*** v. 22, p. 517-524, 2009.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K. & RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits - Review. ***Analyst.***, 125, 989-1009. 2000.

AO, C.; LI, A.; ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D.; TAWATA, S. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. ***Food Control***. v. 19, p. 940-948, 2008.

AOSHIMA, H.; HIRATA, S.; AYABE, S. Antioxidant and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. ***Food Chemistry***, Barling. v. 103, n. 2, p. 617-622, 2007.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population. ***Journal Agricultura. Food Chemistry***. *v. 52,* 1124-1131. 2004.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. ***Journal Ethnopharmacology***. 2008.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potencial antioxidant actions of bioactive components in plant foods. ***Mutation Research***. 523-524: 9-20, 2003.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES S. T. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. ***Brazilian Journal of Food Technology,*** v.9, n.3, p. 209-215, 2006.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSCOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. ***Food Chemistry,*** Barking, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BARBOSA,W. L. R.; PINTO, L. N. P.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. S.; SILVA JR., J. O. C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. ***Brazilian Journal of Pharmacognosy.*** p. 544-548, 2008.

BARBOSA, W. L. R.; PERES, A.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). ***Brazilian Journal of Pharmacognosy.*** p. 333-337, 2006.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: food qualitor health effects. ***European Food Research and Technology***, Berlin, v. 219, n. 6, p. 561-571, Nov. 2004.

BECKMANN, J. S.; YE, Y. Z.; ANDERSON, P. G.; CHEN, J.; ACCAVITTI, M. A.; TARPEY, M. M. White, extensive nitration of protein tyrosines in human

atherosclerosis detected by immunohistochemistry. ***Biological Chemistry Hoppe-Seyler,*** v. 375, p. 81-88, 1994.

BOMPADRE, S. Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples. ***Free Radical Research,*** v. 8, n. 38, p. 831-838, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. ***Lebensmittel Wissenschaft and Technologie***. p. 25-30, 1995.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente**.** ***Química Nova,*** v. 33, nº. 1, p.229-239, 2010.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presente em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). ***Ciência e Tecnologia de Alimenos.*** Campinas, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BUIARELLI, F.; CARTONI, G.; COCCIOLI, F.; LEVETSOVITOU, Z. Determination of phenolic acids in wine by high-performance liquid chromatographic with a microbore column. ***Journal of Chromatography A****;* v.695, p. 229-235, 1995.

BUNKOVA, R.; MAROVA, I.; NEMEC, M. Antimutagenic Properties of Green Tea. ***Plant Foods for Human Nutrition***, v. 60, p. 25-29, 2005.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. ***Life Sciences***, v. 74, p. 2157 – 2184, 2004.

CARRASCO-PANCORBO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURACARRETERO, A.; GALLINA-TOSCHI, T.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. ***Journal of Separation Science***, v. 28, p. 837-858, 2005.

CARVALHO, M. J.; PEDROSA, T. N.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; NUNEZ, C. V.; OHANA, D. T.; PEREIRA, M. M.; LIMA, E. S. Estudo farmacognóstico e atividade in vitro sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae). ***Acta Amazônica.*** 2009.

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. ***Journal Brasileiro Pneumologia*** vol.35, n°.12 São Paulo, 2009.

CHANARAT, P., CHANARAT, N., FUJIHARA, M., NAGUMO, T. Immunopharmacological activity of polysaccharide from the pericarp of mangosteen garcinia: phagocytic intracellular killing activities. ***Journal of the Medical Association of Thailand***, v.80, p.S149-154, 1997.

CHEEL, J.; THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical Scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citrates (*DC.*)* Stapf.). ***Journal Agricultural Food Chemistry*** 2005.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. Uma introdução dos radicais livres. In: CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F., eds. ***Radicais livres em medicina***. Interlivros, Rio de Janeiro, p. 1-13, 1996.

CHOE, E.; MIN, D.B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, v.46, p.1-22, 2006.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. ***Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety***, v. 8, p. 345-358, 2009.

DEMMIG-ADAMS B, ADAMS III WW. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. ***Science*****.** v. 298: p. 2149-2153, 2002.

DIXON R. A.; ACHNINE, L.; KOTA P, LIU CJ, SRINIVASA REDDY MS, WANG L. The phenylpropanoid pathway and plant defense – a genomics perspective. ***Molecular Plant Pathology.*** v. 3:p. 371-390, 2002.

DREOSTI, J. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. ***Nutrition***. v.16, p. 692-694, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. Avaliação da atividade antioxidante utlizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e métodp de sequestro de radicais DPPH. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos.*** v. 26, n° 2, p. 446-452, 2006.

DUBICK, M. A.; OMAYE, S. T**.** Modification of atherogenesis and heart desease by grape wine and tea polyphenols**.** In: Widman, R.E.C. (org). ***Handbook of nutraceuticals and Functional Food*****.** Boca Raton: CRC Press, p. 235-261, 2001.

ESPIN, J.C.; SOLOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. ***Journal Agricultural Food Chemistry****.,* v. 48, p. 1588-1592, 2000.

FALCÃO, E. da S; SILVA, N. H. da; GUSMÃO, N. B. de; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.). ***Acta Farmaucetica Bonaerense***. Departamento Científico del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, 2001.

FERDINANDY, P.; DANIAL, H.; AMBRUS, I.; ROTHERY, R. A.; SCHULZ, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. ***Circulation Research.*** v. 87, p. 241-247, 2000.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. Review. The problems of using onde-dimensional methods evaluate multifunctional food and biological antioxidants. ***Journal of the Science of food and agriculture,*** v. 80, p. 1925-1941, 2000.

FURLONG, E. B.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. ***Vetor.*** v.13, p. 105-114, 2003.

GORELIK, S.; LIGUMSKY, M.; KOHEN, R.; KANNER, J. A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products**.** ***Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology****.,* v.22, p. 41-46, 2008.

GRAMZA, A.; HES, M.; KORCZAK, J. Tea extracts antioxidative potentialin emulsified lipid systems**.** ***Acta Scientisrum. Polonorum Technologia. Alimentaria*** v. 7, n. 3, p. 29-34, Jul. 2008.

HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. Screening of selected avonoids and phenolic acids in 19 berries. ***Food Research International*****,** 32, p. 345-353, 1999.

HAKKINEN, S.H.; KÄRENLAMPI, S.O.; HEINONEN, I.M.; MYKKÄNEN, H.M.; TÖRRÖNEN, A.R. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. ***Journal of the Science of Food and Agriculture.*** v. 77, p. 543–551, 1998.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***., 53, p. 2928-2935. 2005.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, v. 13, p. 572-584, 2002.

HIGDON. J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition,*** v.43, n.1, p.89-143, 2003.

HO, C.K.; HUANG, Y.L.; CHEN, C.C. Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. ***Planta Medica***. 68, p. 975-979, 2002.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P. & SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. ***Journal of Food Composition Analysis***, 21, p. 589-598, 2008.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants**.** ***Journal of Ethnopharmacology***, Lausanne, v. 96, n. 1-2, p. 145-150, Jan. 2005.

JACOB, R. A.; BURRI, B. Oxidative demage and defense. ***American Journal of Clinical Nutrition***. v. 63, p. 985-990, 1996.

JUNG, C.H.; SEOG, H.M.; CHOI, I.W.; PARK, M.W. & CHO, H.Y. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. ***Lebensmittel Wissenscaft and Technology***, v. 39, p. 266-274. 2006.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, M**.** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. ***Food Chemistry, Barking***, v. 94, n. 4, p. 550-557, Mar. 2006.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci.* ***Current Microbiology***, New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, Sept. 2000.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive ***Reviews in food Science and Food Safety*****,** Chicago, v. 3, n. 1, p. 21-33, Jan. 2004.

LEEUWENBURGH, C.; HARDY, M. M.; HAZEN, S. L.; WAGNER, P.; OH-ISHI, S.; STEINBRECHER, U. P.; HEINECKE. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. ***The Journal of Biological Chemistry***. v. 272, p. 1433-1436, 1997.

LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; DOS SANTOS, A. K. L.; FONSECA, A. M.; SANTOS, H. S.; OLIVEIRA, M. F.; COSTA, S. M. O., PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. ***Natural Product Research***. 21, p. 529. 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. ***Brazilian Journal of Food Technology***, Campinas, v. 7, n. 2, p. 187-190, Oct. 2004.

LOPEZ, M.; MARTÝNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRO, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. ***Journal of Chromatography A***; v. 922, p. 359-363, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: ***Instituto Plantarum***, p. 544, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. ***Química Nova,*** v. 25, nº. 3, p. 429-438, 2002.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. ***American Journal of Clinical Nutrition***, Vol. 79, No. 5, 727-747, May 2004.

MANCINI-FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lipídeos polinsaturados. ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,*** São Paulo, v.39, p. 130-133, 2003.

MATSUBARA, S. RODRIGUEZ-AMAYA, D, B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no brasil. ***Ciência e Tecnoogia del Alimentos***, Campinas, 26(2): 380-385, abr.-jun. 2006.

MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; KOBAYASHI, E.; OHGUCHI, K.; ITO, T.; TANAKA, T.; LINUMA, M.; NOZAWA Y. Induction of apoptosis by xanthones from mangosteen in human leukemia cell lines. ***Journal of Natural Products*.v.** 66, p. 1124-1127, 2003.

MAZZA, G.; GIRARD, B.; Functional grape and citrus products. In: Functional Foods Biochemical and Processing Aspects. Lancaster: ***Technomic Publishing Co***, p. 139-159, 1998.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The role of tea in human health: An update, ***Journal of American College Nutrition.*** v. 21 (1) , p. 1–13, 2002.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. O antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. ***Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.*** Campinas, v. 36, n 1, p. 1-11, 2002.

MENDEL, S.; YODIM, M. B**.** Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. ***Free Radical Biology and Medicine*.** v. 37, p. 304-317, 2004.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*** 48, p. 577–599, 2000.

MILARDOVIĆ, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIĆ, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. ***Bioelectrochemistry***, v. 68, p. 175-180, 2006.

MILER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its aplication to monitoring the antioxidants status in premature neonates. ***Clinical Science.*** p. 407-412, 1993.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic tecchniques in the analysis of flavonoids. ***Journal of Chromatography*** *A*, v. 1073, p. 201-227. 2005.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; TOMMASI, N. D. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. ***Food Chemistry,*** v. 92, p. 349–355, 2005.

MORA, A.; PAYA, M.; RIOS, J.L.; ALCARAZ, M. J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. ***Biochem Pharmacol.*** v. 40, p. 793-797, 1990.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, Piracicaba/SP. 2007.

MUKHOPADHYAY, S.; LUTHRIA, D. L.; ROBBINS, R. J. Optimization of extraction process for phenolic acids from cohos (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. ***Journal of the Science of food and Agriculture,*** v.86, p. 156-162, 2006.

NICHENAMETLA, S. N.; TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. H. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, v. 46, p. 161-183, 2006.

NIJVELDT, R. J.; van NOOD, E.; van HOORN, D. E. C.; BOELENS P. G. van NORREN, K.; van LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications**.** ***American Journal of Clinical Nutrition*****,** Bethesda, v. 74, n. 4, p. 418-425, Oct. 2001.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; ACOSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, 30 (Supl.1): 191-196, maio 2010.

NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. –M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. ***Food Chemistry***. v. 76, p. 4519-525, 2002.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S**.** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. ***Food Chemistry***, v. 105, p. 204–214, 2007.

PEREZ-MAGARIÑO, S.; REVILLA, I.; GONZALEZ-SANJOSE, M.L.; BELTRAN, S. Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. ***Journal of Chromatography A***; 847, p. 75–81, 1999.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. ***Journal of Natural Products***, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

POMPEU, D. R.; SILVA, ROGEZ, H. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. ***Bioresourse Technology***. p. 6076-6082, 2009.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary suplements. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** v. 53, n. 10, p. 4290-4302., 2005.

RAMARATHNAM, N; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. ***Triends in Food Science and Technology***. v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

RICHARD A. DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-lnduced Phenylpropanoid Metabolism. ***The Plant Cell,*** Vol. 7, p. 1085-1097, American Society of Plant Physiologists. July 1995.

RIOS, M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; SABOGAL, C.; MARTINS, J.; SILVA, R. N.; BRITO, R. R.; BRITO, I. M.; BRITO, M. F. C.; SILVA, J. R.; RIBEIRO, R. T. **Benefícios das plantas da capoeira para a comunidade de Benjamin Constant**. Pará, Amazônia brasileira. Belém: *CIFOR*. 2001.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* em extratos de erva-mate (*IIex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camélia sinensis*).** Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, 2005.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. ***The Journal of Nutrition.*** Bethesda, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. ***Journal of Chromatography A***; 910, p. 265–273, 2001.

SIDDIQUI, I.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Antioxidants of the Beverage Tea in Promotion of Human Health. ***Antioxidants & redox signaling***. Mary Ann Liebert, Inc.Vol 6, Number 3, 2004.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. ***Food Chemistry.*** v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, M. A. L.; MARQUES, G. S.; SANTOS, T. M. F.; XAVIER, H. S.; HIGINO, J. S.; MELO. A. F. M. Avaliação da composição química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá. ***Acta Scientiarum. Health Sciences***. V. 32, 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidants. ***Revista de Nutrição,*** Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr., 2002.

SOBRINHO, T. J. S.; CARDOSO, K. C. M.; GOMES, T. L. B.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre teores de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. ***Brazilian Journal of Pharmacognosy*.** 23 July 2008.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Phenolics of apple, pear and white grape nectars and their changes with processing and storage, ***Journal of Agricultural and Food Chemistry.*** v.40, p. 1478–1487, 1992.

STALIKAS, C. D. Review Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. ***Journal of separation science*,** v. 30, p. 3268 – 3295, 2007.

TAKABE, W.; NIKI, E.; UCHIDA, K.; YAMADA, S.; SATOH, K.; NOGUCHI, N. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid per oxidation product, acrolein. ***Carcinogenesis,*** v. 22, p. 935-941, 2001.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (TILIACEAE). ***Química Nova***. Vol 28, nº5. 2005.

TAWAHA, K.; ALALI, F. Q.; GHARAIBEH, M.; MOHAMMAD, M.; EL-ELIMAT, T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. ***Food Chemistry***. v. 104. p. 1372-1378. 2007.

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. ***Nutrition***. v. 16, n. 7/8, p. 716-718, 2000.

TRIANTAPHYLLOU, K.; BLEKAS, G.; BOSCOU, D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species of *Laminaceae.* International ***Journal of Food Science and Nutrition*****,** London, v. 52, n. 4, p. 313-317, Jul. 2001.

TURA, D.; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. ***Journal of Chromatography A****,* v. 975, p. 71-93, 2002.

VENDITTI, E.; BACCHETTI, T.; TIANO, L.; CARLONI, P.; GRECI, L.; DAMIANI, E. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity?**.** ***Food Chemistry.*** Volume 119, Issue 4, Pg 1597-1604, 15 April 2010.

VILLAÑO, D. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. ***Analytica Chimica Acta,*** v. 538, p. 601-609, 2004.

WANG, W.; SAWICKI, G.; SCHULZ, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. ***Cardiovascular Research.*** v. 53, p. 165-174, 2002.

WEISBURGER, J. H. Tea and health: a historical perspective. ***Cancer Letters.*** Amsterdam. v. 114, p. 315-317, 1997.

YANEZ, J.A.; ANDREWS, P.K. & DAVIES, N.M. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. ***Journal of Chromatography B***, 848, 159-181. 2007.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxigen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and affect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. ***Journal of Food Composition and Analysis***. v.9, n. 1, p. 41-48, 2006.

CAPÍTULO II

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM INFUSÕES DE ERVAS DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA

Pollyane da Silva Port's[1], Osmar Lameira[2], Marcelo Alexandre Prado[1]

[1]Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP, Brasil; [2]Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Amazônia Oriental), CP 48, 66095-100, Belém, PA, Brasil.

RESUMO

Chás são bebidas populares largamente consumidas no mundo, e fontes significativas de compostos fenólicos. O elevado potencial antioxidante desses compostos está correlacionado com efeitos benéficos a saúde, como a redução da ocorrência de doenças cardiovasculares e câncer, e ainda possuir outras atividades como antialérgica e anti-inflamatória. No entanto, ainda são escassos os estudos sobre o teor de compostos fenólicos em chás de origem brasileira. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* (DPPH e sistema β-Caroteno/Ácido Linoléico) das infusões de folhas de algumas espécies, bem como avaliar o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonóides totais (FT) presentes, por espectrofotometria. As ervas utilizadas nesta pesquisa foram: Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita-cavalo (*Luehea speciosa*), Capim-santo (*Cymbopogon citratus*), Erva-cidreira (*Lippia alba*), Graviola (*Annona muricata*), Jucá (*Caesalpinia ferrea*), Pata-de-vaca (*Bauhinia forticata*), Parirí (*Arrabidaea chica*) e Sacaca comum (*Croton spp*). Baseado nos resultados de CFT, as infusões que obtiveram os maiores resultados foram a de Jucá, que apresentou maior teor (721,08 mg EAG/g), seguida da *L. speciosa* (540,90 mg EAG/g) e a *C. icaco* (497,79 mg EAG/g). De acordo com os resultados de FT, *L. alba* (15,42 mg CE/g) apresentou o maior teor e *C. citratus* o menor (2,35 mgCE/ g). Em relação as análises de atividade antioxidante, a infusão de Jucá apresentou maior eficiência, sendo observado que as infusões que obtiveram resultados superiores de CFT, não apresentaram necessariamente resultados superiores para as análises de atividade antioxidante. Assim, os resultados obtidos dessa pesquisa, contribuem significativamente com novos dados para a literatura atual.

Palavras-chave: *Ervas; infusões; compostos fenólicos; antioxidantes.*

ABSTRACT

Teas are popular beverages widely consumed in the world, providing a significant source of phenolic compounds. The high antioxidant potential of these compounds is correlated with beneficial effects on health, such as reducing the occurrence of cardiovascular diseases and cancer, and still have other properties such as anti-allergic and anti-inflammatory activities. However, there are still few studies about the content of phenolic compounds in Brazilian teas. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the *in vitro* antioxidant activity (DPPH and system β-carotene/linoleic acid) of leaves infusion of some species as well as the content of total phenolic compounds (TFC) and total flavonoids (FT) using spectrophotometry. The herbs assayed in this study were: Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita cavalo (*Luehea speciosa*), Capim-santo (*Cymbopogon citratus*),), Erva cidreira (*Lippia alba*), Graviola (*Annona muricata*), Juca (*Caesalpinia ferrea*), Pata-de-vaca (*Bauhinia forticata*), Parirí (*Arrabidaea chica*) and common Sacaca (*Croton* spp.) Based on results of TFC, the infusions that showed the highest content was Jucá (721,08 mg GAE.g^{-1}), followed by *L. speciosa* (540,90 mg GAE.g^{-1}) and *C. icaco* (497.79 mg GAE.g^{-1}). According to the FT results, *L. alba* and *C. citratus* had the highest and the lowest content, respectively (15,42 and 2,35 mg CE.g^{-1}). For antioxidant activity analysis, Juca infusion showed the highest efficiency, being observed that the infusions which obtained higher results for TFC not necessarily exhibited superior results for the antioxidant activity. Thus, the results of this research contribute significantly to provide new data for the current scientific literature.

Keyword: *Herbs; teas; phenolic compounds; antioxidants*

1. INTRODUÇÃO

A enorme biodiversidade da flora amazônica e a procura cada vez maior nos últimos anos por hábitos alimentares mais saudáveis despertou o interesse da comunidade científica em relação ao potencial de informações ecológicas, fisiológicas, bioquímica e genética que a região possui. Adicionalmente, é claro, da possibilidade de novas descobertas de produtos biológicos oriundos da Amazônia, já que fatores edafoclimáticos podem estar ligados a formação de um maior número de substancias ativas (OLIVEIRA, 2003).

Muitas ervas utlizadas na região amazônica foram consideradas eficazes para algumas patologias já comprovadas cientificamente através de vários estudos biológicos. No entanto, apenas um número muito pequeno deles avaliam o uso tradicional das infusões das folhas (HENNEBELLE et al*.,* 2008; SILVA et al*.,* 2007).

Diversas ervas, infusões de ervas, assim como alguns legumes e frutas têm sido reconhecidos por apresentarem propriedades medicinais e por possuirem muitos efeitos benéficos à saúde, tais como atividade antioxidante, ação estimulante digestivo, anti-inflamatórios, antibióticos, potencial antimutagênico, anticarcinogênico, entre outros.

Os compostos fenólicos presentes nestes materiais vegetais estão intimamente associados a sua atividade antioxidante, efeito este que está principalmente ligado às suas propriedades redução-oxidação (também conhecido como reação redox), atuando por meio de vários mecanismos: atividade sequestradora de radicais livres, atividade de transição-metal-quelante, e/ou capacidade de desativar o oxigênio singlete. Além disso, são conhecidos por desempenharem um papel importante na estabilização da peroxidação lipídica e inibir vários tipos de enzimas responsáveis pela oxidação no organismo. Estes mecanismos múltiplos do potencial antioxidante tornam o grupo dos compostos fenólicos um alvo interessante na busca de fitoquímicos benéficos à saúde (SHAN et al*.,* 2005; SRINIVASAN, 2005; ZHENG et al*.,* 2001).

Em conseqüência das evidências sobre as propriedades dos compostos bioativos, acelerou-se a busca de princípios antioxidantes, levando ao aumento, nas últimas duas décadas, por pesquisas de identificação dos recursos naturais e isolamento de moléculas antioxidantes ativas (LEE et al*.,* 2003; MODUN et al*.,* 2003; TIWARI, 2001; LEE &

SHIBAMOTO, 2000; LANGLEY-EVANS, 2000; LIU & NG, 2000; KITTS et al., 2000; PIETTA, 2000; WANG & JIAO, 2000; HERTOG *et al.,* 1995; HERTOG *et al.,* 1993a).

Dessa forma várias abordagens são apresentadas na literatura para a seleção de espécies vegetais, dentre elas, três tipos são alvos de investigações: randômica, quimiotaxionômica ou filogenética e a etnofarmacológica. Na randômica, a escolha da planta é feita sem qualquer critério, leva em consideração apenas à disponibilidade da planta; na quimiotaxionômica ou filogenética a seleção é feita a partir do conhecimento de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família de uma determinada espécie; e a etnofarmacológica, um dos tipos de seleção mais empregada, na qual a seleção da espécie é feita de acordo com uso e consumo evidenciado por um determinado grupo étnico (ARAUJO, *et al.,* 2008; MACIEL *et al.,* 2002).

Os chás mais consumidos no mundo são o chá preto e verde, que são considerados ricos em compostos fenólicos. Entretanto, no Brasil o que mais se consome é na verdade uma variedade de infusões de ervas (KATALINIC *et al.,* 2006; LANGLEY-EVANS, 2000; LIE & XIE, 2000; HERTOG *et al.,* 1993b).

Pesquisas têm demonstrado que o chá verde produzido no Brasil (especificamente no Estado de São Paulo), apresenta maior quantidade de compostos fenólicos quando comparado ao chá verde de outros países, e tal fato é atribuído as características do clima e do solo (NISHIYAMA *et al.,* 2010; SAITO *et al.,* 2007a, b).

Algumas espécies provenientes da Região Amazônicas, já foram investigadas por Lizcano et al. (2010), Souza et al. (2008), Pompeu & Rogez (2009) e Silva et al. (2007), com relação ao seu conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides totais, bem como as suas atividades antioxidantes presente nas folhas. Porém, esses estudos ainda são pequenos quando comparadas a enorme biodiversidade.

Dessa forma, considerando o interesse cada vez maior na investigação das propriedades antioxidantes de infusões de ervas, especialmente aqueles tradicionalmente utilizadas na medicina popular brasileira, o objetivo do presente estudo foi avaliar o teor de compostos fenólicos totais (CFT), flavonóides totais (FT) e o potencial antioxidante total em nove infusões de ervas provenientes da região Amazônica (*Chrysobalanus icaco*,

Luehea speciosa, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *Annona muricata*, *Caesalpinia ferrea*, *Bauhinia forticata*, *Arrabidaea chica* e *Croton spp*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e equipamentos

Metanol, grau cromatográfico, foi adquirido da J.T.Baker (Phillipsburg, USA) e o clorofórmio, grau analítico, da Alkimia. A água utilizada para o preparo das amostras foi purificada através do sistema Mili-Q (Billerica, USA). O reagente Folin Ciocalteau foi adquirido da Fluka e os reagentes DPPH$^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), β-caroteno, ácido linoléico e Tween 20 foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os equipamentos utilizados foram espectrofotômetro (Marca – Pró-análise/ Modelo – UV-1600), rota-evaporador (Marca – Fisatom/ modelo - 801).

2.2. Amostras

As amostras (folhas) utilizadas neste trabalho para obtenção do extrato aquoso foram fornecidas pela EMBRAPA – AMAZÔNIA ORIENTAL, Belém/ Pará, *in natura*. De cada espécie foram obtidos três (3) lotes, sendo cada lote adquirido a cada seis meses no período de 2009-2010, especificamente nos meses de julho/janeiro/julho.

A coleta foi feita, evitando plantas com ataques de pragas e moléstias, as folhas adquiridas foram as mais próximas das extemidades (mais novas ou recém maduras) obtendo-se para cada espécie cerca de 100g de folhas. Cuidadosamente armazenadas em sacos de papel previamente identificados, o material foi descontaminado pela lavagem para retirada de possíveis sujidades. Em seguida, as folhas foram submetidas ao processo de secagem por 24 horas, em estufa com circulão de ar forçada regulada a uma temperatura de 40 ºC, e posteriormente moídas.

2.2.1. Ervas

As nove ervas utilizadas neste trabalho (Tabela 1) são de consumo e conhecimento popular da região Norte do Brasil. Somente as folhas que foram previamente secas e moídas foram utilizadas no preparo das infusões.

Tabela 1- Espécies utilizadas no preparo das infusões.

NOME POPULAR	NOME CIÊNTÍFICO	FAMÍLIA
Agirú	*Chrysobalanus icaco*	*Chryssobalanaceae*
Açoita cavalo	*Luehea speciosa*	*Tiliaceae*
Capim-santo	*Cymbopogon citratus*	*Poaceae*
Erva-cidreira	*Lippia alba*	*Verbenaceae*
Graviola	*Annona muricata*	*Annonaceae*
Jucá	*Caesalpinia ferrea*	*Compositae*
Pata-de-vaca	*Bauhinia forticata*	*Caesalpiniaceae*
Parirí	*Arrabidae chica*	*Bignoniaceae*
Sacaca comum	*Croton spp*	*Euphorbiaceae*

2.3. Preparo das infusões

Após a trituração das folhas, 0,5 gramas de cada erva foram acrescidas de 25 mL de água destilada, a uma temperatura inicial de 98 ± 2 °C. Após a adição da água destilada, as infusões permaneceram a temperatura ambiente (25 ºC), sem adicional aquecimento, por 10 minutos. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel filtro (Whatman), transferidos para um balão volumétrico de 25 mL para serem devidamente aferidos e posteriormente armazenados em frascos de vidro âmbar com tampa selante, sob refrigeração a 4 ºC, até o momento de realização das análises. Cada amostra foi preparada em triplicata (VENDITTI, *et al.,* 2010; MORAES-DE-SOUZA, 2007; CAI, *et al.,* 2004; LIMA *et al.,* 2004).

2.4. Avaliação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos foi realizada espectrofotometricamente de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteau, utilizando ácido gálico como padrão (SINGLETON *et al.,* 1999) e o resultado expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra. Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos foi transferida para um tubo de ensaio, em seguida, foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção de 1:10 (v/v). A mistura foi agitada e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 7,5% (m/v), com posterior agitação, e então os tubos foram deixados em repouso por duas horas, ao abrigo da luz para que ocorra a reação com formação do complexo de cor azulada. A absorbância foi medida a 740 nm em espectrofotômetro.

2.5. Determinação de Flavonóides Totais

A determinação dos flavonóides dos extratos foi realizada espectrofotometricamente de acordo com o método colorimétrico descrito por Zhishen et al. (1999), utilizando o flavonóide catequina como padrão. Uma alíquota de 1,0 mL dos extratos foi transferida para balões volumétricos de 10 mL, contendo 4 mL de água destilada. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão para construir a curva de calibração em 7 (sete) concentrações diferentes (2,5 a 20 mg L^{-1}). Em seguida foi adicionado 0,3 mL de $AlCl_3$ (10%) e após 6 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz adicionou-se 2 mL de NaOH 1mol/L. Após a adição dos reagentes o balão foi aferido com água destilada, homogeneizado, e a leitura em espectrofotômetro realizada em 510 nm. Os resultados foram expressos em miligrama de equivalente de catequina (EC) por grama de erva.

2.6. Determinação do potencial antioxidante in vitro.

2.6.1. Capacidade antioxidante pelo radical livre DPPH•

A atividade antioxidante foi determinada nos extratos aquosos obtidos (infusões) através da redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), de acordo com metodologia descrita por Scherer & Godoy (2009). O método demonstra a capacidade que

os antioxidantes presentes nas amostras têm em reduzir o radical livre DPPH•. O grau de descoloração indica a eficiência de eliminação de radicais livres das substâncias. No início da reação, o DPPH• apresenta uma coloração púrpura e após a complexação, essa tonalidade é perdida, passando para amarela (CHEEL, *et al.,* 2005). A diferença de absorbância gerada com a perda de coloração do meio é a base da avaliação do potencial antioxidante por esta técnica. Para os extratos, os valores são apresentados como média ± desvio padrão de três determinações. O ácido gálico foi usado como composto de referência. Foi preparada uma solução de DPPH• a 0,039 $mg.mL^{-1}$ em metanol para a análise (SCHERER & GODOY, 2009), devendo esta solução apresentar uma absorbância em 517 nm ao redor de 1,0. Em tubos de ensaios, foram adicionados 3,9 mL da solução do radical DPPH• seguidos pela adição de 0,1 mL das infusões. Após 90 minutos de reação, a temperatura ambiente, na ausência de luz, a absorbância foi determinada por espectrofotometria a 517 nm, sendo que para cada amostra de infusão foi realizado um teste em branco, com adição de água em substituição ao extrato. A determinação do potencial de inibição do DPPH•, foi expresso em termos de porcentagem de inibição (I%), por meio da ***Equação 1.***

$$I\ DPPH\ \% = \frac{(Abs_0 - Abs_i)}{Abs_0} \times 100 \qquad \textbf{(EQ. 1)}$$

Onde Abs_0 é a absorbância do branco (0,1 mL de água substituindo a amostra) e Abs_i é a absorbância da solução reativa contendo a amostra.

Depois de se obter para cada amostra a curva de *I DPPH %* (que foi construida a partir de dez concentrações distintas dependendo da espécie) versus a concentração de amostra dentro do tubo com DPPH•, utilizou-se a equação do modelo gerado para encontrar o IC_{50} (mg/mL de infusão), ou seja, a concentração necessária de amostra para neutralizar 50% dos radicais livres de DPPH• presentes no meio reativo. Com esse valor calculou-se o IAA (índice de atividade antioxidante), que é o parâmetro utilizado para classificar uma

amostra em relação ao seu potencial antioxidante. O cálculo pode ser visualizado na ***Equação 2*** (SCHERER & GODOY, 2009).

$$IAA = \frac{Concentração\ de\ DPPH\bullet\ (\mu g/mL^{-1})}{IC_{50}\ (\mu g/mL^{-1})} \qquad \textbf{(EQ. 2)}$$

2.6.2. Capacidade Antioxidante pelo sistema β-caroteno/ Ácido linoléico

O sistema β-Caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA *et al.,* 2006), e foi baseado no método utilizado por Dastmalchi et al. (2008). Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β-Caroteno induzido pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. Se um antioxidante é adicionado no meio, este reage competitivamente com o radical, inibindo consequentemente a reação do último com o β-caroteno. Logo, o efeito antioxidante é medido, monitorando a velocidade de decaimento da absorbância a 470 nm, comprimento de onda típico do β-caroteno.

Para o preparo da mistura reativa, foi adicionado em balão de fundo redondo para rota-evaporador 20 µL de ácido linoléico, 200 µL de Tween 20, 1 mg de β-caroteno, previamente diluído em clorofórmio (mg/mL). Posteriormente, a mistura foi submetida a completa evaporação do clorofórmio e a esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se 50 mL de água destilada e agitou-se vigorosamente. Após o preparo da mistura, adicionou-se 6 mL da mesma em cada tubo contendo 0,5 mL da infusão (algumas amostras foram diluidas para assegurar que as leituras estivessem na faixa linear da curva padrão) e para o controle fez-se uso de água destilada. Após o preparo, mediu-se a absorbância (Abs 0) de todos os tubos, que deve sempre estar entre 0,6 e 0,7 em comprimento de 470 nm. O BHT (butil hidroxitolueno) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em mg BHT/mL de infusão.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 50º C por 2 horas, para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β-caroteno. As análises foram realizadas em triplicatas. Para a construção da curva fez-se uso do ácido gálico como padrão de

referência sendo a solução de maior concentração de 1 mg/ml. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação (I%), que foi calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle (Ac). A queda da absorbância das amostras (Aam) foi correlacionada com a queda do controle, obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I) através da ***Equação 3*****:**

$$I(\%) = (1 - \frac{(Abs_0 - Abs_{120})_{amostra}}{(Abs_0 - Abs_{120})_{controle}}) * 100 \qquad \textbf{(EQ. 3)}$$

2.7. *Análise Estatística*

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados são médias de três experimentos independentes (n = 3). O tratamento estatístico dos dados foi realizado através da Análise de Variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 95% de confiância. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Teor de compostos fenólicos e flavonóides totais nas infusõe

O teor de compostos fenólicos totais nas infusões das ervas, bem como os de flavonóides totais estão resumidos na **Tabela 2.** Antes das medições para as respectivas análises, todos os extratos aquosos das nove espécies foram submetidos a uma varredura entre 200 e 800 nm, e foi observado uma banda de absorção entre 200 e 330 nm, que é característica de absorção de polifenóis (SILVA *et al.*, 2007) . Deve-se ressaltar que estes resultados são estimativas do teor de fenólicos totais e teor de flavonóides totais em seus equivalentes químicos (ácido gálico e catequinas, respectivamente), já que diferentes compostos fenólicos contribuem de forma diferente para as leituras.

Tabela 2. Resultados obtidos do conteúdo, em base seca, de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonóides totais (FT) para as diferentes espécies estudadas (em forma de infusão) em três lotes.

ERVAS	CFT (mg EAG/g)*				FT (mg EC/g)*			
	1º Lote	2º Lote	3º Lote	MÉDIA	1º Lote	2ºLote	3ºLote	MÉDIA
C. icaco	526,22 ± 30,09^{a,C}	508,42 ± 8,73^{a,C}	457,74 ± 19,37^{a,A}	**497,79 ± 35,53^{A}**	5,92 ± 0,12^{b,D}	6,05 ± 0,19^{b,C,D}	7,89 ± 0,33 ^{a,C}	**6,62 ± 1,00^{B,C}**
L. speciosa	695,18 ± 44,12^{a,B}	525,57 ± 4,46^{b,B}	401,94 ± 3,64^{c,B}	**540,90 ± 147,21^{A}**	14,30 ± 0,27^{a,A}	14,44 ± 0,77^{a,B}	9,65 ± 0,23^{b,B}	**12,80 ± 5,14^{A,B}**
C. citratus	24,00 ± 2,27^{a,F}	30,13 ± 0,26^{a,D}	27,01 ± 0,24^{a,D}	**27,04 ± 3,03^{C}**	2,50 ± 0,06^{a,F}	2,12 ± 0,17^{a,F}	2,43 ± 0,03^{a,E}	**2,35 ± 0,20^{C,D}**
L. alba	115,23 ± 9,75^{a,D,E}	134,23 ± 1,55^{a,C}	145,66 ± 3,65^{a,C}	**131,70 ± 15,37^{B,C}**	9,41 ± 0,34^{c,C}	20,84 ± 0,26^{a,A}	16,01 ± 0,66^{b,A}	**15,42 ± 5,14^{A}**
A. muricata	170,69 ± 8,54^{a,E}	159,17 ± 0,90^{a,C}	147,80 ± 3,17^{a,C}	**159,22 ± 11,44^{B,C}**	4,82 ± 0,09^{b,D,E}	5,50 ± 0,00^{a,b,D}	6,56 ± 0,19^{a,D}	**5,63 ± 0,82^{B,C}**
C. ferrea	788,63 ± 42,75^{a,A}	778,70 ± 5,88^{a,A}	595,91 ± 8,16^{b,A}	**721,08 ± 108,51^{A}**	4,03 ± 0,86^{a,E}	4,06 ± 0,17^{a,E}	3,29 ± 0,15^{a,E}	**3,79 ± 0,40^{C,D}**
B. forticata	189,88 ± 2,04^{a,D,E}	84,31 ± 1,97^{b,C,D}	72,49 ± 0,78^{b,C,D}	**115,58 ± 64,63^{B,C}**	11,53 ± 0,33^{a,B}	7,04 ± 0,21^{b,C}	2,46 ± 0,22^{c,E}	**7,01 ± 4,08^{A,B,C}**
A. chica	194,10 ±11,39^{b,D,E}	181,11 ± 4,19^{b,C}	425,61 ± 10,15^{a,A}	**266,94 ± 137,57^{B}**	14,15 ± 0,03^{a,A}	5,91 ± 0,01^{c,C}	8,78 ±0,08^{b,B,C}	**9,61 ± 3,74^{A,B,C}**
Croton spp	127,05 ±1,55^{a,D,E}	134,53 ± 1,64^{a,C}	115,64 ± 1,26^{a,C}	**125,74 ± 9,51^{B,C}**	0,50 ± 0,11^{a,G}	0,28 ± 0,00^{a,G,Q}	0,54 ± 0,05^{a,F}	**0,44 ± 0,13^{D}**

*Valores representam a média de triplicata ± o desvio padrão, seguidas de letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Tabela de CFT e FT, mostra os resultados obtidos para cada lote, nas diferentes épocas de colheita, bem como a variação existente tanto entre os lotes (para algumas das espécies) como entre as espécies de ervas estudadas, o que explica os desvios relativamente alto obtidos para a média, fato este que pode está relacionado ao período de colheita das folhas ou até mesmo ao estágio de crescimento da planta, dentre outros vários fatores metabólicos de cada planta envolvida, entretanto, as maiores diferenças encontradas foram entre as espécies, destacando-se a espécie *C. férrea.* para fenólicos e *L. speciosa,* para flavonóides.

Os valores médios de compostos fenólicos totais variaram de 27,04 a 721,08 mg EAG/g e os flavonóides totais de 0,44 a 12,80 mg EC/g. As infusões que apresentaram os maiores níveis de fenóis totais foram as infusões obtidas através da espécie *C. férrea* (721,08 mg EAG/g) e *C. icaco* (497,79 mg EAG/g). Os demais extratos aquosos apresentaram resultados inferiores a 540 mg EAC/g. As infusões que apresentaram o maior teor de compostos fenólicos totais, não necessariamente apresentaram o maior teor de flavonóides totais, isso se deve ao fato de a análise de flavonóides totais restringir outras classes, principalmente a dos ácidos fenólicos.

Mesmo aquelas que apresentaram resultados de fenólicos totais, mais próximos, como é o caso das infusões de *C. icaco* e *L. speciosa,* não apresentaram resultados semelhantes para flavonóides. A proporção de flavonóides totais variou consideravelmente, dentre as espécies estudadas, tendo em vista que a infusão que apresentou o maior teor de flavonóides foi a *L. alba* (15,42 mg EC/g), espécie esta que apresentou valor intermediário de compostos fenólicos totais, se comparada as demais infusões.

Dados sobre o perfil dos compostos fenólicos bem como o de flavonóides em infusões nestas plantas ainda são escassos na literatura. No entanto, para a infusão *Cymbopogon citratus,* os resultados obtidos nesse experimento para (CFT), apresentaram valores superiores (27,04 mg EAG/g), quando comparados aos obtidos por Lima & Melo (2005), (16,29 mg equivalente de catequina/g) após 10 minutos de infusão, utilizando catequina ao invés de ácido gálico. Essa variação pode ser explicada tanto pela escolha de diferentes padrões de referência para correlação com os resultados em cada pesquisa, ou ainda, devido ao fato de as espécies estudadas serem provenientes de diferentes regiões.

Para a *A. muricata,* obteve-se para fenólicos resultados de 0,30 mg EAG/mL, valores estes próximos aos encontrados para os extratos em acetato de etila obtidos por Aruoma (2003), de 0,14 mg EAG/mL, este fato pode ser explicado devido aos compostos serem possívelmente mais polares.

Para a infusão da *Arrabidae chica,* Silva et al. (2007), obtiveram para compostos fenólicos totais e flavonóides, respectivamente, em um extrato misto de (metanol; água; etanol; água destilada; e ácido clorídrico), o teor de 10,2 mg EAG/g e 0,06 mg EC/g, respectivamente. No presente trabalho, os resultados obtidos foram de 159,22 mg EAG/ge 5,60 mg EC/g. Apesar do referido autor ter realizado extração exaustiva, os resultados não foram superiores aos encontrados neste trabalho. Tal fato pode estar relacionado com a condição inicial das ervas analisadas, uma vez que o autor utilizou matéria-prima fresca (resultado em base úmida), e neste trabalho foram utilizadas ervas secas, o que pode ter resultado na concentração destes compostos, tanto para compostos fenólicos totais como para flavonóides. O mesmo ocorreu para a espécie *Bauhinia forficata,* que apresentou teor de 16,6 mg EAG/g para compostos fenólicos totais e 3,25 mg CE/g para flavonóides totais (SILVA *et al*., 2007), valores estes também inferiores aos obtidos neste trabalho.

3.2. Atividade antioxidante

3.2.1. Sequestro do radical DPPH$^{\bullet}$

Um levantamento na literatura revelou que não há muitos estudos sobre o potencial antioxidante, na forma que essas infusões de plantas são consumidas, sendo que os já existentes normalmente trabalham com concentrações superiores ao que normalmente se consome, podendo apresentar resultados discrepantes aos analizados na presente pesquisa.

Para a determinação do IC_{50}, é muito importante que seja realizado uma curva em escala linear para cada extrato. Portanto, para todas as amostras foi realizada uma curva com dez pontos distintos, onde a concentração variou de acordo com o tipo de amostra e obteve-se para todas as amostras um $r^2 > 0,99$, no intuito de além de se obter o IC_{50}, avaliar a linearidade de cada um, e a partir dele (IC_{50}) obter o valor do IAA (Índice de Atividade Antioxidante). Assim como para as análises de fenólicos e flavonóides totais os resultados obtidos para as análises de atividade antioxidante estão divididas em lotes (**Tabela 3**) e por último o resultado da média geral obtida por cada amostra.

Tabela 3. Habilidade de infusões de ervas amazônicas no seqüestro do radical DPPH•.

ERVAS	IC_{50} (µg/mL)				IAA			
	1º Lote	2º Lote	3º Lote	**MG**	1º Lote	2º Lote	3ºLote	**MG**
C. icaco	66,40 ± 1,52^{a,B}	69,10 ± 2,22^{a,D}	75,31 ± 6,63^{a,D}	**70,27 ± 4,57^{D,E}**	0,59 ± 0,01	0,57 ± 0,02	0,52 ± 0,05	**0,56 ± 0,03**
L. speciosa	107,74 ± 10,94^{a,B}	105,19 ± 6,80^{a,D}	140,39 ± 14,69^{a,D}	**117,77 ± 19,63^{D,E}**	0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,02	0,28 ± 0,03	**0,34 ± 0,03**
C. citratus	438,02 ± 45,23^{a,A,D}	495,43 ± 48,88^{a,A,C}	574,13 ± 36,59^{a,A,C}	**502,53 ± 68,33^{A}**	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,00	**0,08 ± 0,01**
L. alba	188,60 ± 16,12^{a,B,D}	114,48 ± 7,47^{a,B,D}	164,26 ± 1,18^{a,D}	**155,78 ± 37,78^{D,E}**	0,21 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,24 ± 0,00	**0,26 ± 0,01**
A. muricata	426,85 ± 27,97^{a,A,C,D}	210,73 ± 15,17^{a,A,C,D}	322,91 ± 13,53^{a,C,D}	**320,16 ± 108,09^{B,C}**	0,09 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,01	**0,13 ± 0,01**
C. ferrea	42,24 ± 3,64^{a,B}	47,85 ± 3,04^{a,D}	50,00 ± 0,02^{a,B,D}	**46,70 ± 4,01^{E}**	0,93 ± 0,08	0,82 ± 0,05	0,08 ± 0,00	**0,61 ± 0,04**
B. forticata	135,64 ± 7,97^{a,B,C}	285,68 ± 20,05^{a,A,C,D}	210,66 ± 0,02^{a,B,D}	**210,66 ± 75,02^{C,D}**	0,29 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,19 ±0,00	**0,20 ± 0,01**
A. chica	328,03 ± 7,82^{a,B,C}	402,56 ± 40,71^{a,A,B}	474,69 ± 35,80^{a,A,B,C}	**401,76 ± 73,33^{A,B}**	0,12 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,08 ±0,01	**0,10 ± 0,01**
Croton spp	na*	na*	na*	na*	na*	na*	na*	na*

*Valores representam a média de triplicata ± o desvio padrão, seguidas de letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. IC_{50} = concentração de antioxidante necessária para que ocorra a redução de 50% do radical no meio testado. IAA (índice de atividade antioxidante). *na= não apresentou atividade.

Há uma dificuldade na comparação do potencial antioxidante de diferentes extratos, devido as diversas formas que os resultados são apresentados na literatura (SHARMA & BHAT, 2009). O índice de DPPH• (I%) só mostra a capacidade do extrato em uma concentração fixa utilizada, em reduzir ou não os radicais DPPH•, onde em muitos casos, aumentando-se a concentração do extrato, o %I é aumentado. Quanto ao IC_{50}, este mostra a concentração de extrato necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH• em 50%, no entanto, usando concentrações de DPPH• diferentes, como é o caso das referências encontradas na literatura, os resultados são diferentes para a mesma amostra. Assim, o IAA relaciona a concentração de DPPH• utilizado no ensaio com o IC_{50} da amostra, resultando em um dado constante para cada composto ou extrato da planta, uma vez que procedimentos de extração ou diferentes locais de obtenção de amostras, podem apresentar resultados diferentes (SCHERER & GODOY, 2009). Porém, esta metodologia foi inicialmente empregada para extratos metálicos.

O índice de DPPH• (IAA) do ácido gálico encontrado foi 23 µg/mL, inferior ao relatado na literatura por Scherer & Godoy (2009). No entanto, tal diferença pode ser justificada pelo uso de um solvente diferente ao utilizado pelos autores (metanol). A água foi escolhida como solvente de solubilização do ácido gálico para possibilitar a comparação com as amostras de ervas, extraídas com água, semelhante ao processo convencional de preparo de infusões.

As amostras analisadas variaram estatísticamente com relação ao IC_{50} ao nível de significancia de 95% em relação a média geral, valores esses que variaram entre 46,70 a 502,53 µg/mL, onde a que apresentou menor resultado foi a *C. ferrea*, o que indica uma maior atividade antioxidante, já que, quanto menor o valor do IC_{50} maior será a sua atividade antioxidante.

Com relação aos lotes não foram observados diferenças estatísticas ente os lotes estudados, o que mostra uma fator interessante, levando em consideração as épocas de colheita. As faixas de linearidade estudadas também foram boas, já que todas apresentaram um r^2 acima de 0,99.

Para a infusão da espécie *Croton spp,* não foi detectada atividade antioxidante perante o radical DPPH• na concentração testada (0,02 mg/mL). Consequentemente não foi possível obter os valores de IC_{50} e IAA, o que não significa que a *Croton spp* não possua

atividade antioxidante, mas que pelo método aplicado não apresentou atividade, o que pode ser diferente se um outro método for aplicado, como foi o caso do sistema β-caroteno/ácido linoléico que veremos a seguir.

A *L. alba,* é considerada eficaz para algumas patologias já comprovadas científicamente através de vários estudos biológicos. Entretanto, mesmo sendo uma das ervas mais citadas, em termos de consumo oral, em quase todo o Brasil, um número muito pequeno de estudos avaliam o seu uso tradicional, como é o caso das infusões das folhas (HENNEBELLE *et al.,* 2008). Ramos et al. (2003), obtiveram para a *L. alba,* valores inferiores de IC_{50} se comparados ao encontrado nesta pesquisa, e possivelmente está relacionado ao tipo de solvente empregado (afinidade dos compostos), uma vez que os referidos autores obtiveram seus resultados a partir de extratos hidroalcólicos, outra possibilidade seria a diferença do local de origem da espécie (fatores edafoclimáticos).

A *A. muricata,* vem nos últimos anos sendo alvo de investigações devido a sua possível ação anticarciogênica. Porém, os resultados obtidos pelo método de sequestro do radical $DPPH^{\bullet}$ não foram elevados, o que não descarta sua possível ação, apenas que pelos métodos aplicados nas infusões, não obteve-se valores signifativamente superiores. É comum a relação da alta atividade antioxidante com possíveis atividades biológicas. Entretanto, as comprovações científicas sobre a atividade biológicas desempenhada para esta espécie em solvente aquoso ainda são escassas. No entanto, para solventes orgânicos, os extratos metanólicos e etanólicos de *A. muricata* apresentaram resultados positivos com relação ao potencial no uso como hipoglicemiante, e como uma fonte ativa de substâncias com atividades antinociceptiva e antiinflamatória (ADEYEMI, 2010; DE SOUSA, 2010).

Cheel et al. (2005), obtiveram valores menores que os apresentados neste trabalho para a infusão de *C. citratos,* possivelmente devido a concentração de DPPH• utilizada pelo autor (três vezes maior). Dentre os resultados obtidos para as diferentes infusões, a *C. citratos* foi a que apresentou maior IC_{50}, ou seja, a menor atividade antioxidante para inibir 50% do radial DPPH•. Adeneye & Agbaje (2007), avaliaram a toxicidade oral aguda, bem com à ação hipoglicemiante do extrato aquoso da *C. citratos,* e os resultados indicaram baixa toxicidade e encontrou resultados posítivos na diminuição da glicemia. Entretanto, o autor questiona maiores avaliações farmacológicas para identificação e isolamento dos

princípios ativos hipoglicemiantes e hipolipemiantes na planta, bem como a elucidação dos seus mecanismos de ação.

Para os resultados obtidos a partir da infusão de *C. Ferrea,* que foram os maiores quando relacionados aos demais, a mesma possui um número significativo de trabalhos científicos em relação aos seus efeitos biológicos. Entre eles os mais citados são; antitumoral, anticarcinogênico, antiinflamatório para patógenos orais e hipoglicemiante (SAMPAIO *et al.,* 2009; NAKAMURA *et al.,* 2002a; NAKAMURA *et al.,* 2002b), informações estas que corroboram com os resultados aqui obtidos. Porém todos esses estudos sobre possíveis efeitos biológicos foram realizados com extratos obtidos a partir de solventes orgânicos o que não foi o caso da presente pesquisa para nenhuma das espécies estudadas.

Scherer & Godoy (2009), estipularam o índice de IAA para compostos puros e não há definição para amostras alimentícea, mas foi aplicado para infusões com a intenção de auxiliar na comparação. Para esses autores, valores abaixo de 0,5 representam compostos com baixa capacidade antioxidante. Assim, os resultados obtidos neste estudo, mostraram que quase todas as amostras tiveram valores inferiores a 0,5, ou seja, baixa atividade antioxidante, fato já esperado em se tratando de amostras alimentícias, onde os compostos não estão puros. Entretanto, as infusões obtidas a partir das espécies *C. icaco* e *C. ferrea* apresentaram valores entre 0,5 e 1,0, que segundo o mesmo autor, apresentam moderada atividade antioxidante.

De acordo com as **Tabelas 2 e 3**, onde tem-se os resultados, obtidos para fenólicos totais e atividade antioxidante em IC_{50}, respectivamente, aplicou-se um teste de correlação, no qual, utilizou-se a média de cada espécie, e como resultado observou-se uma baixa correlação ($r = 0,49$). Porém, quando a correlação é feita entre fenólicos totais e o IAA uma relação maior é encontrada ($r = 0,74$). O que entende-se a partir do teste aplicado é que nem sempre os resultados obtidos para análise de atividade antioxidante seguirá necessariamente os valores obtidos para análise de fenólicos totais, podendo haver assim discordâncias entre os resultados.

Infusões de ervas apresentam compostos fenólicos bastante diversos e complexos, apresentando compostos de lento, moderado e rápido comportamento cinético, e de diferentes habilidades em doar elétrons. Outro fator está na própria diluição dos compostos.

A diferença dos compostos fenólicos existentes faz com que diferentes concentrações de infusões tenham diferentes habilidades em sequestrar radicais (KULISIC *et al.,* 2006).

3.2.2. Sistema β-caroteno/ácido linoléico

O sistema β-caroteno/ácido linoléico (BCAL) é constituido por uma emulsão, sendo considerado um sistema aquoso-lipídico, e é usualmente utlizado para se avaliar a atividade antioxidante de um extrato ou antioxidante isolado em inibir o processo de oxidação do sistema, avaliado em duas horas. Diferentemente do que ocorre no método DPPH•, os antioxidantes devem apresentar maior estabilidade para expressar maior atividade antioxidante. Na **Tabela 4** estão apresentados os resultados divididos em lotes da atividade antioxidante das infusões das ervas, determinada pelo sistema BCAL.

Tabela 4. Atividade antioxidante das infusões de ervas amazônicas pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico (BCAL).

ERVAS	BCAL (µg/mL)*			
	1º Lote	2º Lote	3º Lote	**MG**
C. icaco	$39,55 \pm 1,34^{a,B}$	$44,15 \pm 5,16^{b,B}$	$47,22 \pm 2,79^{a,b,B}$	$\mathbf{43,64 \pm 4,38^{B}}$
L. speciosa	$19,16 \pm 1,10^{a,D}$	$21,40 \pm 4,27^{a,b,E}$	$31,66 \pm 1,50^{b,D,E}$	$\mathbf{24,07 \pm 6,08^{C,D}}$
C. citratus	$8,87 \pm 0,25^{a,D}$	$7,26 \pm 0,53^{a,C,D}$	$9,08 \pm 1,33^{a,F}$	$\mathbf{5,81 \pm 0,62^{D}}$
L. alba	$33,27 \pm 4,41^{a,C,D}$	$26,97 \pm 4,84^{a,E}$	$38,75 \pm 1,81^{a,B,D}$	$\mathbf{33,00 \pm 3,69^{B,C}}$
A. muricata	$17,07 \pm 1,72^{a,D}$	$19,44 \pm 0,33^{a,C,E}$	$30,83 \pm 5,16^{a,D,E}$	$\mathbf{22,44 \pm 7,02^{C,D}}$
C. ferrea	$89,27 \pm 8,00^{a,A}$	$113,17 \pm 3,92^{a,A}$	$86,41 \pm 5,05^{a,A}$	$\mathbf{93,29 \pm 13,92^{A}}$
B. forticata	$20,23 \pm 1,80^{a,D}$	$22,54 \pm 1,75^{a,E}$	$16,43 \pm 1,19^{a,C,F}$	$\mathbf{20,12 \pm 2,48^{C,D}}$
A. chica	$16,37 \pm 2,21^{a,D}$	$22,49 \pm 0,36^{a,E}$	$27,26 \pm 0,07^{a,C,E}$	$\mathbf{22,04 \pm 0,88^{C,D}}$
Croton spp	$8,05 \pm 1,33^{a,D}$	$6,14 \pm 1,12^{a,D}$	$9,67 \pm 1,54^{a,F}$	$\mathbf{7,95 \pm 1,89^{D}}$

*Valores representam a média de triplicata ± o desvio padrão, seguidas de letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Com relação a este método, também foram poucos os trabalhos científicos relacionados as infusões das plantas estudadas na presente pesquisa o que dificultou a comparação com a literatura.

A atividade antioxidante foi observada no extrato aquoso de todas as nove espécies analisadas, inclusive para a infusão de *Croton spp* (**Tabela 4**), que para a análise de potencial antioxidante DPPH•, não apresentou atividade. Os resultados variaram em relação a média geral, entre 5,81 a 93,29 µg BHT/mL. Sendo que os menores valores foram os obtidos pelas espécies *C. citratus e C. Spp* (5,81 e 7,95 µg BHT/mL, respectivamente), e o maior para a *C. férrea* (93,29 µg BHT/mL.).

Com relação as diferenças estatísticas, entre os lotes estudados apenas as infusões provenientes das *C. icaco* e a *L.speciosa,* se diferenciaram estatísticamente com relação ao 3º lote, as demais nenhuma apresentou diferença estatística. O que não ocorreu entre as ervas, já que a maior parte houve se diferenciou estatísticamente ($p<0,05$) dentre as espécies estudadas. Todos os resultados das infusões foram superiores aos obtidos para o BHT, onde para obter um resultado de 96,7% necessitou de uma concentração de 0,30 mg/mL, enquanto que as infusões apresentavam uma concentração máxima de 0,01 mg/mL. Entretanto, a infusão da *C. ferrea* para enquadrar-se ao método necessitou ser diluida 3 vezes, obtendo assim o maior resultado. A atividade antioxidante encontrada no extrato aquoso dessa espécie pode ser parcialmente atribuída ao seu maior teor de compostos fenólicos totais.

A partir dos coeficientes de correlação para BCAL, obteve-se uma correlação de ($r = 0,67$), obtidas a partir das médias dos resultados de CFT e BCAL. Porém, não significativa. Kähkönen et al. (1999), junto com Velioglu et al. (1998), também relataram que nenhuma correlação significativa foi encontrada entre o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e a atividade antioxidante (Sistema β-caroteno/ácido linoléico) de 120 extratos vegetais em nenhum dos subgrupos estudados. Estes autores comentam que diferentes compostos fenólicos apresentam diferentes respostas colorimétricas quando se utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. Da mesma forma que a resposta do potencial antioxidante dos compostos fenólicos a um substrato lipídico varia consideravelmente, dependendo da estrutura química e as condições de oxidação.

Assim, a atividade antioxidante de um extrato não pode ser previsto com base no seu teor de fenólicos totais, já que além da composição fenólica, outros fatores podem desempenhar um papel importante na atividade antioxidante de produtos vegetais. Devido a isso, é muito difícil comparar a atividade antioxidante entre os compostos em sistemas complexos (AMAROWICZ *et al.,* 2005).

Na **FIGURA 4** pode ser visualisado a diferença entre os resultados obtidos para cada análise de atividade antioxidante (média) em porcentagem.

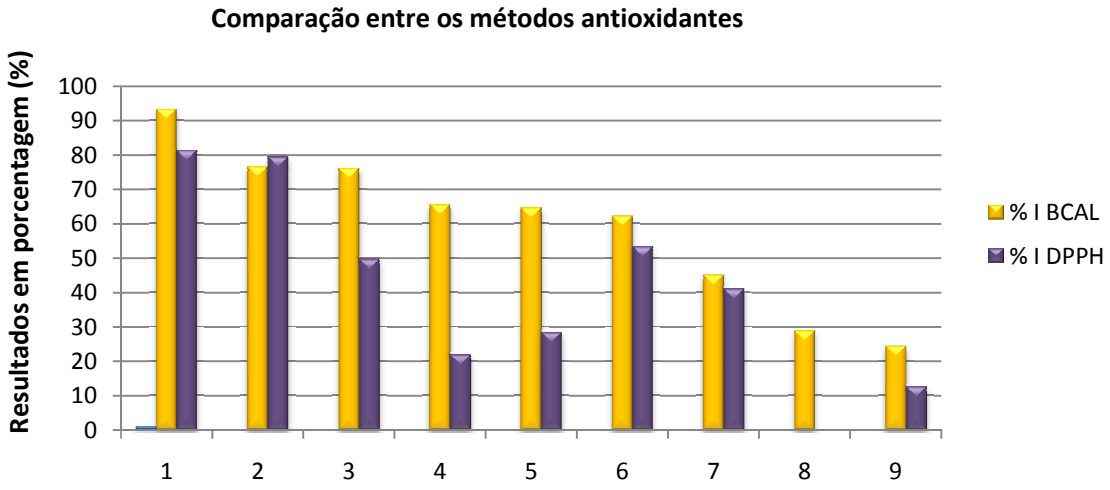

Figura 4. Comparação entre os métodos que avaliam a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• e pelo sistema BCAL. **(1)** Jucá (*C. férrea*), **(2)** Agirú (*C. icaco*), **(3)** Erva cidreira (*L. alba*), **(4)** Parirí (*A. chica*), **(5)** Graviola (*A. muricata*), **(6)** Açoita-cavalo (*L. speciosa*), **(7)** Pata de vaca (*B. forticata*), **(8)** Sacaca (*C. ssp*), **(9)** Capim -santo (*C. citratus*).

Como mostra a figura, nem sempre as amostras que apresentaram o melhor resultado para uma das análises, que avaliou a atividade antioxidante, necessariamente apresentou valores também superiores para outra metodologia. Isso porque, os dois métodos de capacidade antioxidante usado neste estudo envolvem mecanismos de reações diferentes. Por isso, não é surpreendente encontrar diferenças entre as medições de atividade antioxidante entre os ensaios, uma vez que cada um tem um diferente mecanismo de ação ou diferentes condições de reação. Estudos realizados por Cai et al (2004) e Surveswaran, et al (2007), que juntos avaliaram quase 300 espécies diferentes, relataram o mesmo fato em suas pesquisas.

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados, mostraram que as infusões possuem atividades antioxidante para os dois métodos empregados, com excessão da infusão de *C. Spp.* que não apresentou atividade, na concentração utilizada, para o método de DPPH•. Os resultados obtidos a partir destes ensaios fornecem dados que podem tornar possível a classificação dos extratos com relação ao teor de compostos fenólicos e flavonóides totais, assim como seu potencial antioxidante.

Através do presente estudo, pode-se observar que a atividade antioxidante nem sempre se correlacionou com a presença do maior teor de compostos fenólicos. Nesta investigação, o extrato aquoso obtido das a partir das folhas da *C. ferrea* foi a que se mostrou ter a maior atividade antioxidante bem como o maior teor de compostos fenólicos, quando comparada as outras infusões estudadas. Maiores investigações devem ser realizadas, no intuito, de caracterizar compostos antioxidantes nos extratos aquosos de folhas comumente consumidas, assim como seu modo de ação.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENEYE, A. A.; AGBAJE, E. O. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus Stapf.* in rats. ***Journal of Ethnopharmacology,*** v.112, p. 440–444, 2007.

ADEYEMI, D. O; KOMOLAFE, O. A, ADEWOLE, O. S.; OBUOTOR, E. M.; ABIODUN A. A; ADENOWO, T. K.; Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with extracts of *Annona muricata*. ***Folia Morphologica (Warsz).*** May; 69(2): p. 92-100, 2010.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL' J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies ***Food Chemistry*** v. 84, p. 551-562, 2004.

ARUOMA, O.I**.** Methodological considerations for characterizing potencial antioxidant actions of bioactive components in plant foods. ***Mutation Research.*** 523-524: 9-20, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. ***Technology***, 28, p. 25–30, 1995.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. ***Life Sciences***; 74, p. 2157 – 2184, 2004.

CHEEL, J.; THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical Scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citrates (*DC.*)* Stapf.). ***Journal Agriculture Food Chemistry***. 2005.

DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.J.D.; OINONEN, P.P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (Melissa officinalis L.) extract***. Food Science and Technology.*** v. 41, p. 391 – 400, 2008.

DE SOUSA O. V.; VIEIRA, G. D.; DE JESUS, R. G.; DE PINHO, J; YAMAMOTO, C. H.; ALVES, M. S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. ***International Journal of Moeculard Sciences.*** v. 6, p. 2067-78. 2010

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos,*** v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FERDINANDY, P.; DANIAL, H.; AMBRUS, I.; ROTHERY, R. A.; SCHULZ, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. ***Circulation Research.***. v. 87, p. 241-247, 2000.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, S.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba.* ***Journal of Ethnopharmacology*** v.116 p. 211–222, 2008.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticancerogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 41, p. 1242–1246, 1993.

HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F. Flavonoid intake and longterm isk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. ***Archives of Internal Medicine,*** 155, p. 381–386, 1995.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. J.; HEINONEN, M.; Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 47, p. 3954–3962 1999.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. ***Food Chemistry.*** v. 94 p. 550–557, 2006.

KITTS, D. D.; YUAN, Y. V.; WIJEWICKREME, A. N.; HU, C. Antioxidant properties of a North American gingseng extract***. Molecular and Cellular Biochemistry***, 203, p. 1–10. 2000.

KULISIC, T.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; MILOS, M. Antioxidant Activity of Herbal Tea Infusions, ***Food Technology Biotechnology***. *v.* 44, p. 485–492 2006.

LANGLEY-EVANS, S. C. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. ***International Journal of Food Science and Nutrition***, 51, p. 181–188, 2000.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant properties of aroma compounds isolated from soybeans and mung beans. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** 48, p. 4290–4293. 2000.

LEE, S. E.; HYUN, J. H.; HA, J. -S.; JEONG, H. S.; KIM, J. H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. ***Life Sciences***, 73, p. 167–179, 2003.

LIE, C., & XIE, B. Evaluation of the antioxidant pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** 48, p. 6362–6366, 2000.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. ***Brazilian Journal of Food Technology****,* Campinas, v. 7, n. 2, p. 187-190, Oct. 2004.

LIU, F.; NG, T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. ***Life Sciences***, 66, p. 725–735. 2000.

LIZCANO, L. J.; BAKKALI, F.; RUIZ-LARREA, M. B.;RUIZ-SANZ, J. I. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use**.** ***Food Chemistry***, V. 119, p. 1566-1570, 2010.

MODUN, D.; MUSIC, I.; KATALINIC, V.; SALAMUNIC, I.; BOBAN, M. Comparison of protective effects of catechin applied *in vitro* or in vivo on ischemia-reperfusion injury in the isolated rat hearts. ***Croatian Medical Journal***, 44(6), p. 690–696, 2003.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, Piracicaba/SP. 2007.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, JR. F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 81, p. 135_/137, 2002a.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, JR. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. ***Cancer Letters***, v. 177, p. 119-124, 2002b.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K. PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var

assamica): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos,*** Campinas, 30(Supl.1): p. 191-196, maio 2010.

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C.; **Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal**. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica.* v. 1, p. 49-58, 2003.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. ***Journal of Natural Products***, 63, p. 1035–1042, 2000.

POMPEU, D. R.; SILVA, ROGEZ, H. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. ***Bioresourse Technology***. p. 6076-6082, 2009.

RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ, C. A.; RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants ***Journal of Ethnopharmacology***, V. 87, p. 241-246, 2003.

SAITO, S. T; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Full validation of a simple method for determination of catechins and caffeine in Brazilian green tea (*Camelia sinensis* var. *assamica*) using HPLC. ***Chromatographia***, v. 65, n. 9-10, p. 607-610, 2007a.

SAITO, S. T; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar) extracts. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*****,** v. 55, n. 23, p. 9409-9414, 2007b.

SAMPAIO, F. C; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. ***Journal of Ethnopharmacology***, V. 124, p. 289-294, 2009.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. ***Food Chemistry,*** 112, p. 654-658, 2009.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N.; AMAROWICZ, R. Natural antioxidants from low-pungency mustard flour. ***Food Research Internationa,*** v. 27 (1994), p. 489–493, 1994.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. ***Journal Agricultural and Food Chemistry,*** 2005, *53* (20), p. 7749–7759.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH• antioxidant assay revisited. ***Food Chemistry***, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SILVA, E.M ; J.N.S. SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. ***Food Chemistry,*** V. 101, p. 1012-1018, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. JR. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. ***Methods in Enzymology***. 830, p. 152-178, 1999.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; REES, J-F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazoniam plant extracts; A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. ***Food Chemistry,*** v. 106, p. 331-339, 2008

SRINIVASAN, K. Role of spices beyond food flavoring: Nutraceuticals with multiple health effects. ***Food Reviews International***. 2005, *21*, p. 167–188.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. ***Food Chemistry,*** v.102, p. 938–953, 2007.

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. ***Current Science***, 8, 1179–1187. 2001.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D.; Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** v. 46, p. 4113–4117, 1998.

VENDITTI, A.; BACCHETTI, T.; TIANO, L.; CARLONI, P.; GRECI, L.; DAMIANI, E. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity?. ***Food Chemistry.*** v. 119, 15 April 2010, p. 1597-1604, 2009.

WANG, S. Y.; JIAO, H. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 48, 5672–5676, 2000.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. . ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 2001, *49*, 5165−5170.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals**.** ***Food Chemistry***. 12 January 1999**.**

CAPÍTULO III

COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE ERVAS DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA

Pollyane da Silva Port's[1], Osmar Lameira[2], Marcelo Alexandre Prado[1]

[1]Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP, Brasil; [2]Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Amazônia Oriental), CP 48, 66095-100, Belém, PA, Brasil.

RESUMO

O interesse em substâncias que possuem ação antioxidante frente a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, e o papel dos antioxidantes da alimentação na prevenção de doenças tem despertado o interesse da comunidade científica, aumentando significativamente os estudos relacionados às ervas consumidas no Brasil. Assim este trabalhou visou fornecer dados sobre o conteúdo de compostos fenólicos presentes nos extratos metanólicos das ervas: Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita-cavalo (*Luehea speciosa*) e Jucá (*Caesalpinia ferrea*). O Chá Verde comercial *(Camellia sinensis)* foi analisado para efeito comparativo. A identificação bem como a quantificação dos compostos fenólicos foi realizada atrávés da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), mas antes os extratos metanólicos foram hidrolisados, no intuito de facilitar a identificação. Os compostos fenólicos analisados no presente estudo foram o ácido gálico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, miricetina, quercetina e rutina. O método foi submetido a processos de validação, mostrando boa linearidade e repetitividade dentro dos limites aceitáveis (< 10%). Os limites de detecção variaram entre 0,63 e 0,98 $mg.L^{-1}$ e de quantificação entre 1,7 e 2,97 $mg.L^{-1}$. Dentre os compostos que foram estudados, foram identificados e quantificados em mg/g nas amostras de Jucá (ácido gálico 0,59 e quercetina 0,13), Agirú (ácido gálico 0,45, miricetina 0,78 e quercetina 0,14), Açoita-cavalo ((+)-catequina 1,20 e quercetina 0,14) e Chá verde (ácido gálico 0,24, (-)- epicatequina 2,44, (+)- catequina 0,68, miricetina 0,16 e quercetina 0,66).

Palavra-chave: *Compostos fenólicos; antioxidantes; ervas; CLAE*

ABSTRACT

The interest in substances that have antioxidant action related with the prevention of chronic diseases, and the role of antioxidant in disease prevention has interested the scientific community increasing the studies related to the herbs consumed in Brazil. So, this work aimed to provide data about the content of phenolic compounds present in methanol extracts of Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita-cavalo (*Luehea speciosa*) and Jucá (*Caesalpinia ferrea*) herbs. Commercial green tea (*Camellia sinensis)* was analyzed for comparison. The identification and quantification of phenolic compounds was performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), but the methanol extracts were previously hydrolyzed in order to facilitate identification. The phenolic compounds analyzed in this study were gallic acid, (-)-epicatechin, (+)-catechin, myricetin, quercetin and rutin. The method was validated, showing good linearity and repeatability within acceptable limits (<10%). The detection limits ranged from 0,63 to 0,98 mg L^{-1} and quantitation limits were between 1,70 and 2,97 mg L^{-1}. Among the studied compounds, it was possible to identify and quantify (mg g^{-1}) some of them in the samples as follows: Jucá (0,59 of gallic acid and 0,13 of quercetin), Agirú (0,45 of gallic acid, 0,78 of quercetin and 0,14 of myricetin) , Açoita-cavalo (1,20 of (+)-catechin and 0,14 of quercetin) and green tea (0,24 of gallic acid, 2,44 of (-)-epicatechin, 0,68 of (+)-catechin, 0,16 of myricetin and 0,66 of quercetin).

Keywords: *Phenolic compounds; antioxidants; herbs; HPLC*

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em seis biomas distintos e dentre eles está a Região Amazônica que possui um grande potencial a ser explorado como fornecedora de biocompostos com alta atividade antioxidante, em particular os compostos fenólicos. Estudos recentes mostram que a Amazônia possui um total de 33 mil espécies de plantas superiores e desse montante, cerca de 10 mil são portadoras de princípios ativos (INPA, 2009; NOLDIN et al*.,* 2006; OLIVEIRA, 2003).

No Brasil, especificamente na Região Amazônica existe uma grande variedade de comidas exóticas e de plantas medicinais com propriedades antioxidantes, cuja caracterização pode apresentar algum potencial para o desenvolvimento sustentável da região (SOUZA et al*.,* 2008).

Dentre estes compostos estão os compostos fenólicos, que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo conhecidos atualmente mais de 8.000 estruturas. São metabólitos secundários de plantas, que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Tais substâncias ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos e fazem parte integral da dieta humana (MANACH et al*.,* 2004).

A atividade antioxidante de frutas e hortaliças é principalmente relacionada com o seu conteúdo de fenólicos, carotenóides, vitaminas C e E. Entre estes antioxidantes, os compostos fenólicos constituem uma categoria ampla e complexa de compostos. Eles incluem flavonóides, o maior e mais estudado grupo de polifenóis. O interesse em flavonóides antioxidantes aumentou consideravelmente devido à sua elevada capacidade no sequestro de radicais livres, espécie altamente reativa associada à várias doenças crônico-degenerativas. Esta propriedade tem sido evidenciada por um grande número de ensaios *in vitro*. (BENZIE, 2003; CADENAS & PACKER, 2002; NIJVELDT et al*.,* 2001). Alguns estudos relatam, que os flavonóides inibem a peroxidação lipídica e oxidação do LDL. Além disso, dados experimentais, *in vitro*, sugerem que os flavonóides possuem propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas, anti-virais e anticarcinogênicas (NIJVELDT et al*.,* 2001).

Pesquisas biológicas vem sendo realizados em diversas matrizes vegetais de países em desenvolvimento, e como consequência um número cada vez maior de compostos vem sendo isolados e caracterizados estruturalmente, incluindo diversos derivados de flavonóides, tanto agliconas e glicosídeos, pertencentes a diferentes classes químicas (flavonas, flavanonas, flavonóis e dihidroflavonóis) (MONTORO et al*.,* 2005; BRACA et al*.,* 2003).

A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Geralmente, flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos. O mesmo composto ainda pode apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (MACHADO et al*.,* 2008).

A extração destes compostos em material vegetal é influenciada pela sua natureza química, bem como a presença de substâncias interferentes, já que, extratos de material vegetal são sempre uma mistura de diferentes classes de compostos fenólicos que são solúveis no sistema de solvente utilizado. Em sua grande maioria o uso de uma solução hidroalcoólica parece oferecer resultados satisfatórios para este processo (SOUZA et al*.,* 2008; CHIRINOS et al*.*, 2007; SILVA, et al*.*, 2007; PERVA-UZUNALIC et al*.,* 2006).

Muitas técnicas colorimétricas são utilizadas como ferramentas de detecção *"in vitro"* da presença de compostos fenólicos, entretanto se faz importante caracterizar estes compostos de forma individual no alimento e para este fim, vários métodos analíticos são empregados, porém a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é sem dúvida a técnica mais comumente utilizada, podendo estar acoplada a detectores como o de arranjo de diodos, o de fluorescência ou o de espectrometria de massas (GUERRERO et al*.,* 2009; DOWNEY & ROCHFORT, 2008; KÖHLER et al*.,* 2008; MCCALLUM et al*.,* 2007; BRAVO et al*.*, 2006; KALLITHRAKA et al*.,* 2001; SCHIEBER et al*.,* 2001; LEE, 2000; MERKEN & BEECHER, 2000; HÄKKINEN et al*.,* 1999).

É importante que o método seja abrangente, rápido e rico em informações espectrais, com a finalidade de identificação e quantificação, tudo isso em uma única corrida cromatográfica. Uma característica cada vez mais importante destes métodos é o arquivamento de dados que torna possível a comparação cruzada das amostras e padrões (HARNLY et al*.*, 2007). Uma revisão mais detalhada de alguns dos métodos utilizados para

a determinação de compostos fenólicos em alimentos dos últimos anos é discutida por Harnly et al. (2007).

Quanto a determinação quantitativa de flavonóides glicosídicos individuais é difícil porque a maioria dos compostos de referência não existe para aquisição comercial. Além disso, mais de 50 glicosídios diferentes para cada um dos flavonóides mais comuns já foram descritos. A hidrólise dos glicosídios para liberar as agliconas oferece um método mais prático para determinação dos flavonóides .

O objetivo deste estudo foi adaptar um método de separação para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos de três extratos metanólicos de plantas provenientes da Região Amazônica (Agirú (*Chrysobalanus icaco*), Açoita-cavalo (*Luehea speciosa*), Jucá (*Caesalpinia ferrea*), e para nível de comparação o mesmo foi feito com amostras de chá verde (*Camellia sinensis*) adquiridos no mercado local (Campinas – São Paulo).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padrõe e reagentes

A acetonitrila de grau cromatográfico foi obtida da JT Baker (Phillipsburg, USA), o ácido orto-fosfórico, foi adquirido da marca MERCK. A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore Corporation). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45 μm de diâmetro. Os padrões de ácido gálico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, rutina, miricetina e quercetina foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada padrão em metanol grau cromatográfico, em concentração de 1000 μg/mL, conservadas a –18ºC e protegidas da luz.

2.2. Amostras

As amostras (folhas) utilizadas neste trabalho para obtenção do extrato metanólico foram fornecidas pela EMBRAPA – AMAZÔNIA ORIENTAL, Belém/ Pará, *in natura,* com excessão da amostra *C. sinensis* que foi obtida no comércio local, em forma de sachês, em três lotes de três marcas diferentes. Dentre as espécies coletadas, para cada uma foram obtidos três (3) lotes, sendo que cada lote foi adquirido em uma época diferente do ano (intervalo de 6 meses). As folhas assim obtidas foram então submetidas ao processo de

secagem em estufa com circulação de ar forçada (Novatécnica, modelo NT 513) a uma temperatura de 40 ºC, para posterior moagem. Para a etapa de identificação e quantificação os 3 lotes foram previamente homogeneizados a fim de se obter resultados mais representativos a respeito de cada amostra em questão.

2.3. Extração das amostras

A extração dos compostos fenólicos das folhas foi realizada de acordo com o método descrito por Perva-Uzunalic et al. (2006). Resumidamente, 20 mL de metanol: água (80:20) foi adicionado a um erlemeyer contendo 1 g de folhas secas e moídas. Para as amostras de *C. sinensis*, as mesmas foram removidas dos seus respectivos sachês, no intuito de promover as mesmas condições a todas. Os frascos então foram submetidos a agitação por 3 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, em seguida as amostras foram submetidas a filtragem a vácuo (papel filtro-Whatman). Os extratos foram então completados para um volume final de 25 mL, e assim foram armazenados em frascos ambar a -18 ºC.

2.4. Hidrólise dos compostos fenólicos glicosídicos

Antes da análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência, foi realizada a hidrólise dos flavonóides glicosídicos. Para realização da hidrólise seguiu-se a metodologia descrita por Toyoda et al. (1997), onde primeiramente uma alíquota de 15 mL dos extratos metanólicos foram adicionados de 13 mL de metanol grau cromatográfico (com 1 $g.L^{-1}$ butil-hidroxi-anisol), mais 12 mL de água destilada e, a esta mistura, 10 mL HCl 6M, obtendo-se assim uma solução final resultante, de metanol aquoso 50% (v/v) e 1,2 $mol.L^{-1}$ de HCl. A hidrólise procedeu em banho sob refluxo a 90 ºC por 30 minutos. Após este período, o extrato foi resfriado em banho de gelo e aferiu-se o volume com metanol em balão de 50 mL. Aproximadamente 3 mL do hidrolisado foi filtrado em filtro de politetrafluoretileno 0,45 μm (Millipore, EUA) para posterior injeção.

2.5. Equipamentos e condições cromatográficas

A análise dos compostos fenólicos dos extratos metanólicos foi realizada empregando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Varian 1050 com injetor

manual, alça de amostragem de 20 µL e bomba ternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV-Vis) da marca Agilent G1315B. O equipamento foi operado à temperatura ambiente (25 ± 2°C) e os dados cromatográficos foram obtidos e processados pelo sistema ChemStation. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo fase reversa, C_{18} (250 mm x 4,5 mm) da marca Waters, Spherisorb ODS e pré-coluna com o mesmo recheio e diâmetro da coluna. O método cromatográfico foi baseado em Matilla et al. (2000), com modificações. A fase móvel constituiu-se em Ácido orto-fosfórico a 1% em água (A) e Acetonitrila (B). O gradiente de eluição iniciou-se na proporção 90:10 em um fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$. Essa condição manteve-se por 5 minutos, a partir de então, a concentração de "A" decresceu, até que em 40 minutos a proporção chegou 60:40, e em seguida aumentou, em 45 minutos, para 90:10, onde permaneceu até os 50 minutos, finalizando assim a corrida. A detecção de todos os compostos foi realizada a 210 nm, quanto a identificação dos compostos, esta baseou-se nos espectros obtidos nos tempos de retenção, comparados com os dos padrões injetados diariamente, e co-cromatografia com os padrões.

2.6. Metodologia de Validação

Para auxiliar na etapa de identificação dos compostos, foi realizada uma comparação entre a resposta da amostra extraída com a resposta de uma solução padrão. Os parâmetros de comparação foram os tempos de eluição, os espectros de absorbância e fortificação de amostras. Para avaliar a faixa linear de trabalho, foram construídas curvas de calibração para cada um dos padrões que foram diluídos em metanol. As concentrações empregadas foram entre 1 $mg.L^{-1}$ e 14 $mg.L^{-1}$, sendo que as curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho. A repetitividade do método foi avaliada, utilizando padrão, em dois níveis de concentração (4 e 8 $mg.L^{-1}$) em 10 injeções de cada nível (mesmo dia). A precisão intermediária foi avaliada comparando-se curvas analíticas feitas em três dias diferentes. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados como a mínima concentração correspondente, dividindo-se o desvio padrão pelo coeficiente angular da curva analítica, para cada um dos padrões. Esse resultado foi multiplicado por 3,3 para o LD e por 10 para obter o LQ (RIBANI et al*.,* 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dados da literatura relacionados a identificação de compostos fenólicos majoritários presentes nos extratos das ervas da presente pesquisa não foram encontrados, assim a seleção de padrões foi realizada a partir dos resultados obtidos em pesquisas científicas, que empregaram extratos de ervas, principalmente as que incluem a *Camellia sinensis,* no intuito de selecionar os padrões empregados na CLAE para as amostras desta pesquisa. Dentre os compostos mais encontrados as catequinas são sem dúvida uma das mais abordadas em matrizes de ervas, principalmente para a *C. sinensis*.

Para dar início ao processo experimental foi realizada a adaptação do método analítico e a avaliação da seletividade dos compostos fenólicos selecionados.

Após todos os compostos estarem devidamente separados entre si no cromatograma (**Figura 5**), foi dado início a análise da faixa linear de trabalho, através da construção de curvas de calibração a partir das soluções estoques. As concentrações avaliadas ficaram entre 1 e 14 $mg.L^{-1}$ (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 $mg.L^{-1}$), conferindo resultados satisfatórios, devido a obtenção do coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,99. Através desses resultados, foi possível calcular Limite Detecção e Limite de Quantificação para cada um dos compostos (**TABELA 5).**

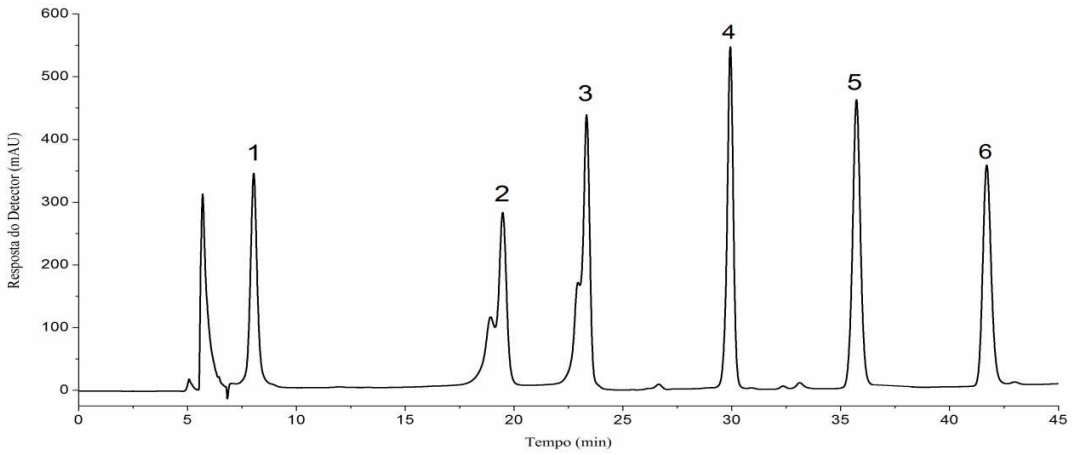

Figura 5: Perfil cromatográfico obtido através da análise dos padrões de **(1)** Ácido Gálico, **(2)** (-)-Epicatequina, **(3)** (+)-Catequina, **(4)** Rutina, **(5)** miricetina e **(6)** Quercetina, em concentração de 10 $mg.L^{-1}$. As condições de análise estão descritas no item 2.5 do presente capítulo.

TABELA 5. Equações das curvas de calibração dos compostos fenólicos, coeficiente de correlação (r^2), Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

Compostos Fenólicos	Equações da Curva de Calibração	r^2	LD ($mg.L^{-1}$)	LQ ($mg.L^{-1}$)
Ácido Gálico	y = 165,17x + 43,021	r² = 0,9931	0,865	2,621
Epicatequina	y = 271,33x - 99,605	r² = 0,9932	0,980	2,970
Catequina	y = 279,79x - 29,657	r² = 0,9985	0,573	1,735
Rutina	y = 79,838x - 0,7881	r² = 0,9953	0,894	2,709
Miricetina	y = 240,89x - 40,074	r² = 0,9962	0,634	1,921
Quercetina	y = 160,91x - 64,262	r² = 0,994	0,821	2,487

Após a determinação da faixa linear de trabalho, duas concentrações dentro da faixa foram escolhidas, com base em Ribani et al. (2004), para avaliar a repetitividade (4 e 8 $mg.L^{-1}$). Cada concentração foi injetada por 10 vezes consecutivas, o tempo de eluição e a área foram avaliados. Pode-se observar através da **TABELA 6 e TABELA 7** que os desvios padrões relativos (DPR) para a concentração de 4 e 8 $mg.L^{-1}$, resultantes da divisão de cada desvio padrão pela sua respectiva média, estão dentro de limites aceitáveis (< 10%) (RIBANI et al*.,* 2004).

TABELA 6 Resultados da avaliação da repetitividade do método. Desvios padrões relativos (DPR) obtidos para a concentração 4 $mg.L^{-1}$.

Compostos Fenólicos	Tempo			Área		
	Média*	Desvio Padrão	DPR (%)	Média*	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido Gálico	7,86	0,20	2,53	757	11,09	1,47
Epicatequina	19,44	0,47	2,43	1057,37	48,65	4,60
Catequina	23,43	0,38	1,60	1077,23	48,55	4,51
Rutina	30,38	0,28	0,93	329,31	7,34	2,23
Miricetina	36,20	0,44	1,22	906,50	37,56	4,14
Quercetina	42,09	0,59	1,39	566,87	26,85	4,74

* Média de dez injeções.

Tabela 7. Resultados da avaliação da repetitividade do método. Desvios Padrões relativos obtidos para a concentração 8 $mg.L^{-1}$.

Compostos Fenólicos	Tempo			Área		
	Média*	Desvio Padrão	DPR (%)	Média*	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido Gálico	7,72	0,34	4,40	1577,10	7,19	0,46
Epicatequina	19,91	0,29	1,45	2091,17	107,16	5,12
Catequina	23,00	0,38	1,60	2269,77	37,61	1,66
Rutina	29,54	1,98	6,70	687,64	53,03	7,71
Miricetina	36,58	0,52	1,42	1913,80	55,37	2,89
Quercetina	42,63	0,86	2,02	1204,93	31,00	2,57

* Média de dez injeções.

Após a obtenção dos dados da repetitividade, procedeu-se com os experimentos dos extratos metanólicos das ervas (*C. sinensis, C. ferrea, C. icaco e L.speciosa*) tendo como objetivo identificar e quantificar os compostos presentes nas amostras, entretanto, para tal foi realizado primeiramente uma hidrólise, no intuito, de liberar as agliconas e assim auxiliar o processo de identificação bem como a quantificação. A determinação quantitativa de flavonóides glicosídicos individuais é difícil porque a maioria dos compostos de referência não existe para aquisição comercial. Além disso, mais de 50 glicosídeos diferentes para cada um dos flavonóides mais comuns já foram descritos (HERTOG et al*.,* 1992a). A hidrólise dos glicosídios para liberar as agliconas oferece assim um método mais prático para determinação dos flavonóides.

A identificação então foi realizada a partir dos cromatogramas obtidos de cada injeção, e os mesmos foram comparados aos espectros de absorção dos padrões e os seus respectivos tempo de retenção. Para confirmação dos compostos foi realizada uma co-cromatografia. As concentrações dos produtos identificados foram calculadas a partir de curvas padrão obtidas com produtos comerciais cromatografados em condições idênticas. Os resultados obtidos dos extratos metanólicos hidrolisados encontram-se expressos na **TABELA 9**, a seguir:

Tabela 9. Conteúdo de compostos fenólicos nos extrato metanólicos hidrolisados, analisados segundo as condições estabelecidas neste estudo.

CF Identificados	**Concentração (mg/g)***			
	C. sinensis	***C. ferrea***	***C. icaco***	***L. speciosa***
Ácido Gálico	0,24 ± 0,02	0,59 ± 0,05	0,45 ± 0,00	-
Epicatequina	2,44 ± 0,08	-	-	-
Catequina	0,69 ± 0,06	-	-	1,20 ± 0,05
Rutina	-	-	-	-
Miricetina	-	-	0,78 ± 0,03	-
Quercetina	0,66 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01

* Valores ± o desvio padrão.

Através dos resultados nota-se que, dos seis padrões utilizados no estudo, apenas a rutina não foi encontrada em nenhuma das amostras, resultado pouco peculiar, quando se trata por exemplo da *C. sinensis*, porém o mesmo pode ser entendido devido este composto ser referido na literatura em quantidades muito pequenas quando comparados aos seus demais constituintes, e o fato de o limite de detecção e quantificação para este determinado composto, na presente pesquisa, ser relativamente alto, pode ter impossibilitado na sua detecção, outro fator relevante pode estar relacionado aos interferentes, que também podem ter impedido a sua detecção, devido os mesmo se apresetarem no mesmo tempo de eluição deste composto, além destes fatores, também pode ter ocorrido a hidrólise total da rutina, e a mesma ter sido quantificada como quercetina, já que quimicamente a quercetina é uma aglucona da rutina . A miricetina também não foi encontrada na *C. sinensis,* a sua detecção pode ter sido impossibilitada, devido a interferentes presentes no mesmo tempo de eluição do composto ou devido a hidrólise incompleta do mesmo. O cromatograma obtido para a amostra comercial da *C. sinensis* pode ser visualizado na **FIGURA 6.**

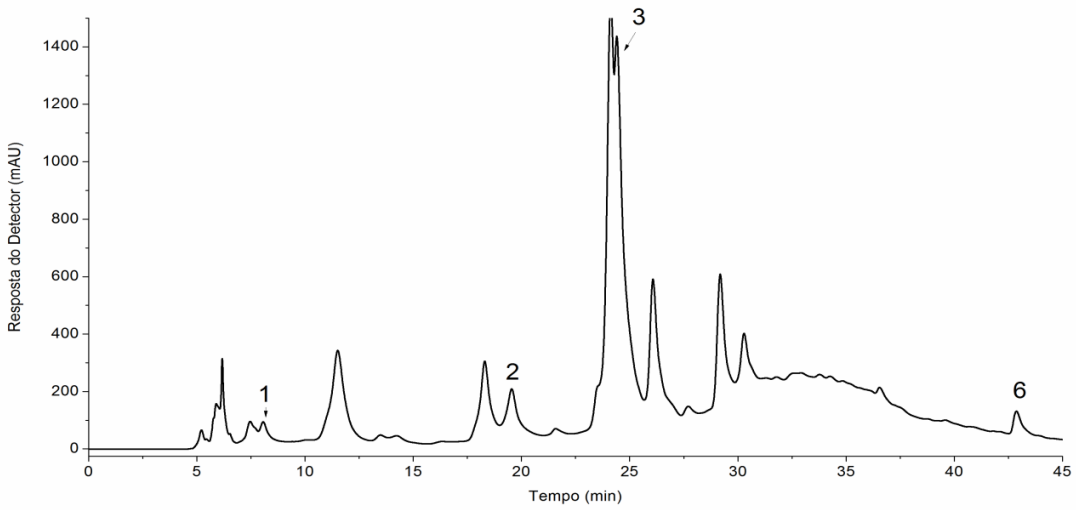

Figura 6. Perfil cromatográfico obtido através da análise do extrato metanólico hidrolisado da *C. sinensis*. **(1**). **Ácido Gálico, (2) (-)-Epicatequina, (3) (+)-Catequina e (6) Quercetina**. As condições de análise estão descritas no item 2.5 do presente capítulo.

Nota-se que dentre as amostras estudadas, a *C. sinensis* foi a que apresentou o maior número de compostos identificados e quantificados. Fato este esperado, já que as condições empregadas nas amostras eram as melhores, para esta erva, segundo a literatura,

principalmente no que diz respeito ao processo de hidrólise, que pode ter favorecido a *C. sinensis* em detrimento das demais.

Levando em consideração que cada matriz pode reagir de forma diferente nesta etapa, Toyoda et al. (1997), avaliaram o processo de hidrólise em 27 espécies de ervas, entre elas a da *C. sinensis*, variando concentração de ácido (HCl) e tempo de aquecimento e verificaram que cada uma delas obteve um ponto ótimo distinto com relação essas duas variáveis, entretanto, foi na variável tempo que observou as maiores discrepancias de resultados (tempos variaram entre 5 minutos e 7 horas). Tais resultados podem estar aparentemente envolvido ao fato de algumas espécies apresentarem um número maior de compostos glicosilados que outras, o que acarretaria consequentemente em um tempo de hidrólise também maior, para obtenção das agliconas, e/ou devido a diferença de sítio de ligação desses açúcares a estes compostos. Logo, são necessários estudos mais aprofundados para estabelecer as melhores condições de hidrolise para cada erva em específico.

Além disso, dependendo do tipo de açúcar ligado ao flavonóide, muitos parâmetros podem influenciar na eficiência da hidrólise como a composição de solventes, tempo de extração, concentração do ácido empregado, temperatura de extração entre outros, podendo ocorrer degradação ou mesmo hidrólise incompleta do glicosídio. Hertog et al. (1992b), definiram em seu estudo o uso do ácido clorídrico para hidrólise dos flavonóides, bem como maior eficiência da extração dos flavonóides com solução aquosa a 50% de metanol, porém o tempo iria variar de acordo com cada matriz.

Dos resultados obtidos para a *C. sinensis*, os mesmos encontram-se em conformidade quando comparados a literatura, existindo em alguns casos variações, para um ou outro compostos, porém não significativas, e que provavelmente se dá devido a origem da amostra bem como o processo de extração empregado por cada autor como Zhao et al. (2010), Perva-Uzunalić et al. (2006), Liang et al. (2001), indicando assim, a eficiência das metodologias aqui empregadas.

Para o extrato de *C. ferrea* obteve-se resultados pouco esperados, mesmo apresentando dentre as ervas estudadas (Capítulo 2), o maior teor para as análises aplicadas e obtendo valores superiores de ácido gálido quando comparado ao da *C. sinensis*. Porém, o fato de a hidrólise ter sido realizada nas condições comumente empregadas para a *C. sinensis*, pode

ter desfavorecido esta amostra devido ao tempo de hidrólise empregado, tanto para mais como para menos, isto é, ou degradando os compostos presentes ou aplicando tempo insuficiente para que as agliconas fossem totalmente liberadas (como pode ser visto na **FIGURA 7**) o que é o mais provável. Souza et al. (2010), em seus estudos sobre a *C. ferrea* encontrou valores alto de carboidratos em folhas e sementes desta espécie. Uma alternativa seria a otimização da hidrólise, bem como o emprego da espectrometria de massas para garantir a identificação mais aproximada dos demais compostos.

É importante ressaltar que fatores abióticos naturais como a radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano também influenciam no metabolismo e na produção destes compostos e ainda, fatores artificiais, como poluentes (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

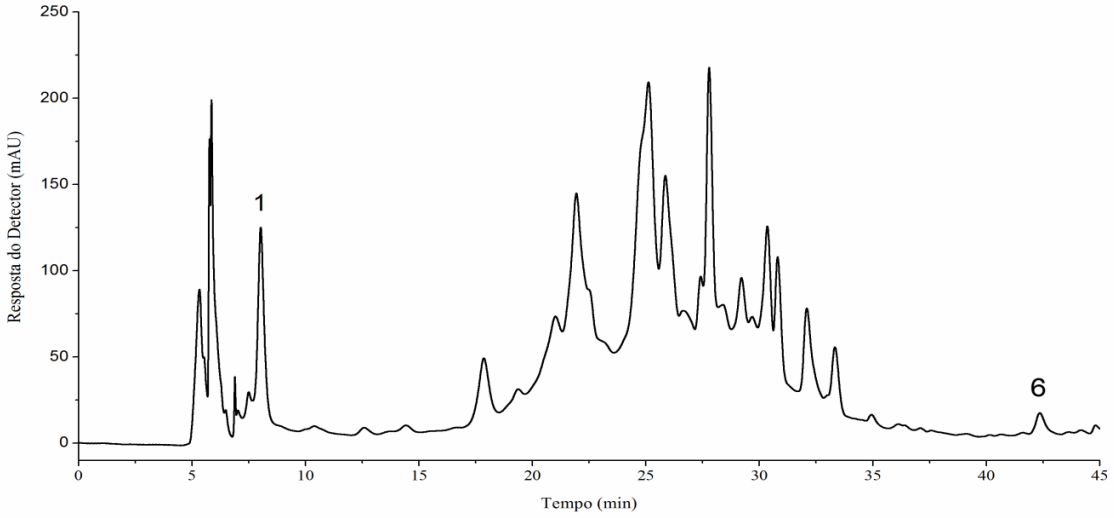

Figura 7. Perfil cromatográfico obtido através da análise do extrato metanólico hidrolisado da *C. ferrea.* **(1).Ácido Gálico; (6) Quercetina.** As condições de análise estão descritas no item 2.5 do presente capítulo.

Obteve-se dentre os compostos identificados e quantificados para a espécie *C. icaco,* a quercetina, porém o valor obtido para este determinado composto pode estar sendo sub ou super estimado, já que um dos interferentes presente na respectiva amostra apresentou-se em tempo de eluição muito próximo ao da quercetina, impossibilitando a integração precisa do pico como pode ser visto na **Figura 8.**

Dentre as amostras empregadas, com excessão da *C. sinensis,* esta foi a que apresentou o melhor resultado, com relação ao método de hidrólise empregado, já que houve uma

considerável diminuição na linha de base quando comparado ao mesmo extrato não hidrolisado, visto que tal resultado, pode estar possivelmente relacionado, ao seu menor número de compostos glicosilados. Encontrou-se na literatura alguns trabalhos relacionados a esta espécie, porém a grande maioria trata da extração de óleos essenciais provenientes da mesma e/ou seus possíveis efeitos biológicos. Entretanto, Barbosa et al. (2006), realizaram a identificação de alguns compostos presentes tanto no extrato metanólico como no extrato aquoso, obtidos a partir das folhas desta espécie, através da CLAE acoplado a um espectrômetro de massas, e os respectivos autores também encontraram os compostos miricetina e quercetina e alguns dos seus derivados, porém não os quantificou o que impossibilitou a comparação entre os resultados. Para o extrato aquoso o mesmo autor encontrou a rutina, o que não aconteceu para o extrato metanólico, resultado também semelhante ao da presente pesquisa, e que pode ser explicada devido a afinidade existente entre o composto da amostra e o solvente utilizado para extração.

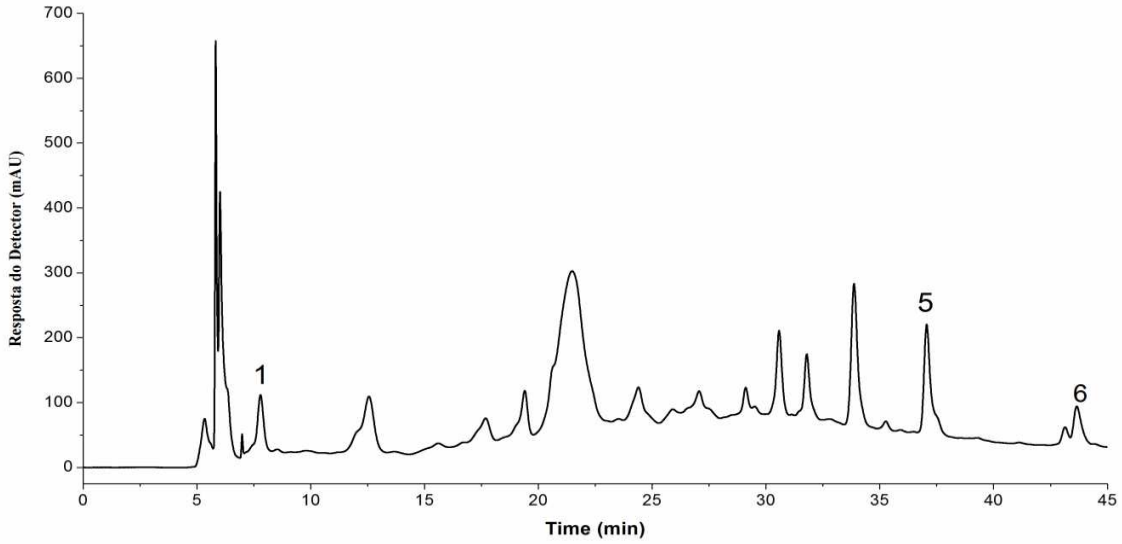

Figura 8. Perfil cromatográfico obtido através da análise do extrato metanólico hidrolisado do *C. icaco.* **(1).Ácido Gálico; (5) Miricetina e (6) Quercetina.** As condições de análise estão descritas no item 2.5 do presente capítulo.

Por último, no extrato de *L. speciosa* não foram encontrados estudos relacionados à identificação e quantificação para esta espécie, todavia, Tanaka (2006) encontrou dentre outros compostos para o mesmo gênero (*Luehea divaricata*), a (-)- epicatequina, composto

este não encontrado para a espécie *Luehea speciosa*, fato este que pode ter ocorrido ou devido a hidrólise incompleta, fazendo com que o composto fosse eluido em tempo diferente da aglicona ou ainda, fato mais provável, por se tratarem de espécies diferentes. Os resultados encontram-se graficamente representados na **Figura 9**.

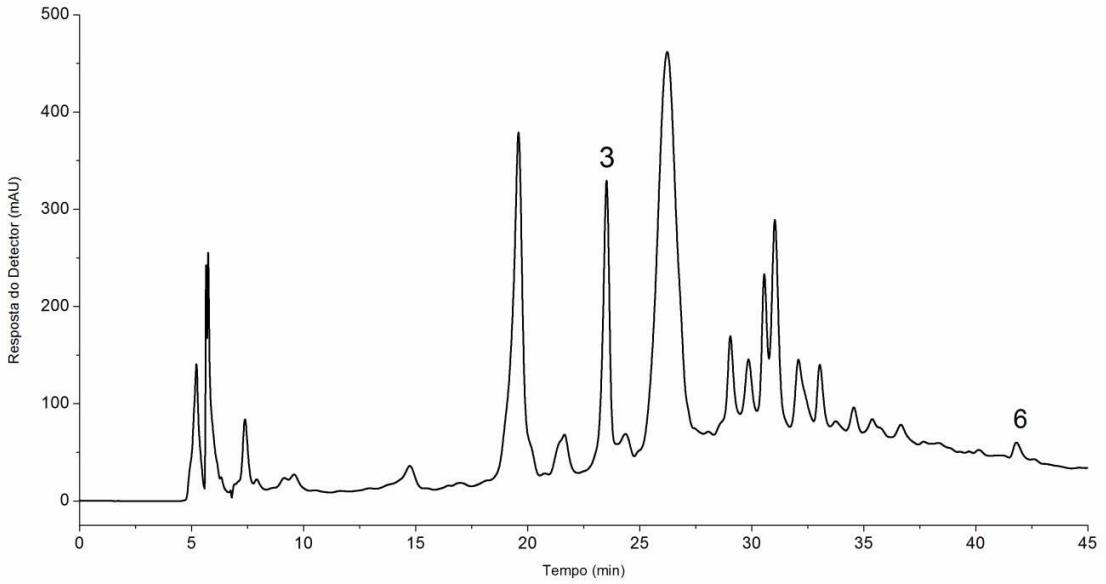

Figura 9. Perfil cromatográfico obtido através da análise do extrato metanólico hidrolisado do *L. speciosa.* **(3)**.(+)- **Catequina e (6) Quercetina.** As condições de análise estão descritas no item 2.5 do presente capítulo.

Para as ervas utlizadas na presente pesquisa foram encontrados estudos relacionados as suas atividades biológicas algumas até, já comprovadas cientificamente, porém, um número muito pequeno deles avaliam quanto aos seus constituintes fenólicos majoritários (HENNEBELLE et al*.,* 2008), o que prejudica a comparação entre métodos de análises em questão. Com relação aos efeitos biológicos *in vivo* abordados na literatura não se fez relação deles com os compostos presentes aqui identificados e quantificados por CLAE, já que se trata de informações relativamente pequenas para ser utilizada como comparativo e/ou associado aos seus possíveis efeitos. Porém os dados obtidos na presente pesquisa são relevantes quando relacionado a dados na literatura, já que pouco ou quase nenhum trabalho foi encontrado com dado enfoque.

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que os três extratos de plantas amazônicas contêm compostos fenólicos, e embora a *C. ferrea* tenha apresentado resultados significativos no Capítulo 2, o mesmo não ocorreu na etapa cromatográfica, o que não significa necessariamente que a respectiva amostra possui poucos compostos, mas apenas que, com relação aos compostos estudados neste trabalho, estes não foram encontrados, com excessão do ácido gálico e da quercetina. A rutina também não foi detectada em nenhuma das amostras estudadas.

Um fator que deve ser considerado é a etapa de hidrólise, no qual pode-se avaliar através dos resultados obtidos, que os parâmetros empregados talvez não tenham sido suficientes para obtenção das agliconas ou o inverso, o que mostra a importância da otimização da mesma para cada espécie.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSCOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile**.** ***Food Chemistry*****,** Barking, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BARBOSA, W. L. R.; PERES, A.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). ***Brazilian Journal of Pharmacognosy*****.** p. 333-337, 2006.

BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants, ***Comparative Biochemistry and Physiology a – Molecular & Integrative Physiology,*** v. 136, p. 113–126, 2003.

BRACA, A.; BILIA, A. R.; MENDEZ,J.; PIZZA, C.; MORELLI. I.; DE TOMMASI, N. Chemical and biological studies on *Licania* genus. In: A.U. Rahman, Editor, ***Studies in natural products chemistry,*** v. 28, Elsevier, Amsterdam, p. 35–67, 2003.

BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. ***Analytica Chimica Acta*** 563, p 84 – 92, 2006.

CADENAS, E.; PACKER, L. **Handbook of antioxidants**, Marcel Dekker, New York 2002.

CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers**.** ***Separation and Purification Technology*****,** v.55, p. 217–225, 2007.

DEGÁSPARI, C.H., WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DOWNEY,M.O.; ROCHFORT,S.. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. ***Journal of Chromatography A,*** v 1201 ,p 43–47, 2008.

FRANCISCO, M. L. D. L.; RESURRECCION, A. V. A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. ***Food Chemistry***. v. 117, p.. 356-363, 2009.

GUERRERO R. F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; PUERTAS, B.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-BARROSO, C.; CANTOS-VILLAR, E. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. ***Food Chemistry*** v. 112, p. 949–955, 2009.

HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. Screening of selected -avonoids and phenolic acids in 19 berries. ***Food Research International***, v. 32, p.345-353, 1999.

HARBORNE, B.J.; WILLIAMS, A.C. Advances in flavonoids research since 1992. ***Phytochemistry***. v. 55, p. 481-504, 2000.

HARNLY, J. M.; BHAGWAT, S.; LIN, L. Z. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements, ***Analytical Bioanalytical Chemistry***, v. 389 (1), p. 47–61, 2007.

HEIM, E.K.; TAGLIAFERRO, R.A.; BOBILYA, J.D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. ***Journal of Nutritional Biochemistry***. v.13, n.1, p. 572–584, 2002.

HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; Fidanza, F. Flavonoid intake and long-term risk of coronary-heart-disease and cancer in the 7 countries study, ***Archives of Internal Medicine*****,** v.155, p. 381–386. 1992.a

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 40, p.1591-1598, 1992.b

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia, Jan. 2009. Disponível em: <http://projetos.inpa.gov.br/ctpetro/pg_noticias.php?vID=107> Acesso em: 28 Fev. 2010.

KÖHLER,N.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. ***Journal of Chromatography A***, 1177, p. 114–125, 2008.

LEE, H. S. HPLC analysis of phenolic compounds. In: L.M.L. Nollet, Editor, ***Food analysis*** by HPLC (2nd ed.), Marcel Dekker Inc, New York, 2000.

LIANG, Y.; MA, W.; LU, J.; WU, Y. Comparison of chemical compositions of *Ilex latifolia* Thumb and *Camellia sinensis* L. ***Food Chemistry.*** v.75, p. 339-343, 2001.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. ***Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*****.,** UFJF, v. 26, p. 37, 2008.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. ***The American Journal. of Clinical Nutrition,*** v. 79, p. 727-47, 2004.

MARTÍNEZ-FLOREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J., Revisión: Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. ***Nutrición Hospitalaria,*** Organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral, Madrid, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MATILLA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry****, v.*48, p. 5834-5841, 2000.

MCCALLUM,J.L.; YANG,R.; YOUNG, J.C.; STROMMER ,J.N.; TSAO.R. Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. ***Journal of Chromatography A***, v. 1148, p. 38–45, 2007.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA,* Campinas, v. 36, n.1, p. 1-11, 2002.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*****,** v. 48, p. 577–599, 2000.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; TOMMASI, N. D. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. ***Food Chemistry,*** v. 92, p. 349–355, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food, ***Journal of Chromatography A***. v. 1054 (1–2),p. 95–111, 2004.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. E. C. V.; BOELENS, P. G.; NORREN, K. V.; LEEUWEN, P. A. M. V. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action

and potential applications**,** ***American Journal of Clinical Nutrition,*** v. 74 , p. 418–425, 2001.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica**.** ***Química Nova,*** Vol. 29, No. 3, 549-554, 2006

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C.; **Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal**. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica.* v. 1, p. 49-58, 2003.

PERVA-UZUNALIC, A.; SKERGET, M.; KNEZ, Z.; WEINREICH, B.; OTTO, F.; GRUNER, S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine, ***Food Chemistry*** v.96, p. 597–605, 2006.

PIETA, P.G., Flavonoids as antioxidants. ***Journal of. Natural Products*** v. 63, p, 1035-1042, 2000.

RIBANI, M; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. & MELO, L.F.C. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**.** ***Química Nova,*** v27, p 771-780, 2004.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. - ***Journal of Chromatography*** A; 910, p. 265–273, 2001.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. ***Food Chemistry*** v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ. F. A.; A.; SIERAKOWSKI, M. R. *Caesalpinia ferrea var. ferrea seeds* as a new source of partially substituted galactomannan ***Carbohydrate Polymers***, v. 82, Issue 3, p. 641-647, 2010.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; REES, J-F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazoniam plant extracts; A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. ***Food Chemistry,*** v. 106, p. 331-339, 2008.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (TILIACEAE). ***Química Nova***. Vol 28, nº5. 2005.

TOYODA, M.; TANAKA, K.; HOSHINO, K.; AKIYAMA, H.; TANIMURA, A.; SAITO, Y. Profile of potentially antillergic flavoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. ***Journal of Agricultural Food Chemistry*****,** Easton, v. 45, n. 7, p. 2561-2564, Jul. 1997.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. ***Trends in Food Science and Technology***, v. 15, n. 9, p. 422-433, 2004.

ZHAO, Y.; CHEN, P.;LIN, L.; HARNLY, J. M.; YU, L.; LI, Z. Tentative Identification, Quantitation, and Principal Component Analysis of Green pu-erh, Green, and White Teas Using UPLC/DAD/MS ***Food Chemistry.*** Received 30 April 2010; revised 8 November 2010; accepted 10 November 2010. Available online 16 November 2010.

CONCLUSÃO GERAL

O *C. ferra*, o *C. icaco*, e a *L. speciosa* foram as ervas que apresentaram em forma de infusão o maior teor para análise de fenólicos totais, entretanto para flavonóides totais a *L.alba* foi a que se destacou.

Das análises que avaliaram a atividade antioxidante nas as infusões, a *C. ferrea* foi a que apresentou maior capacidade antioxidante nos dois métodos aplicados (DPPH• e BCAL).

Das infusões analisadas, as obtidas a partir da *C ssp.* foi a única que não apresentou a atividade para a método de DPPH•.

Para os resultados obtidos para fenólicos totais e os métodos que avaliaram a capacidade antioxidante, não observou-se uma correlação linear significativa entre eles.

Foi observado que a atividade antioxidante não variou, para quase nenhuma das infusões, entre os lotes estudados independente da época de colheita.

Para o método de fenólicos que foi utilizado nos extratos das ervas, para quantificação e identificação de compostos fenólicos, este mostrou-se eficaz para a determinação dos compostos aqui avaliados.

Para os compostos avaliados não foi detectado em nenhuma das amostras a rutina. A quercetina foi o único composto que foi identificado e quantificado em todos os extratos.

SUGESTÃO

A utilização de um espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear seriam também uma alternativa, no intuito de confirmar os compostos aqui identificados e quantificados, bem como avaliar a existências de outros possíveis compostos existentes nas amostras dando ao experimento uma margem de confiabilidade maior.

Embora o presente trabalho exponha resultados de estudos das propriedades antioxidante destes compostos *in vitro,* e para algumas das espécies tenha sido realizada a identificação de alguns compostos por CLAE, seria importante se os mesmos fossem avaliados através de mecanismos envolvidos na atividade antioxidante *in vivo,* o que não foi o caso da presente pesquisa.