

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRISCILA SILVA RIBEIRO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES,
ANTOCIANINAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS
METANÓLICO PARA FOLHA E ETANÓLICO PARA CASCA DE *Caryocar*
*brasiliense***

PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2019

PRISCILA SILVA RIBEIRO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES,
ANTOCIANINAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS
METANÓLICO PARA FOLHA E ETANÓLICO PARA CASCA DE *Caryocar*
*brasiliense***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia Campus Patos de Minas como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Profa. Dra. Enyara Rezende Moraes

Me. Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz

PATOS DE MINAS – MG

DEZEMBRO DE 2019

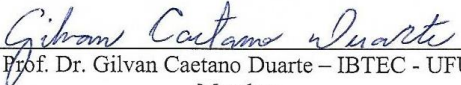
PRISCILA SILVA RIBEIRO

Determinação do teor de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e atividade antioxidante de extratos brutos metanólico para folha e etanólico para casca de *Caryocar brasiliense*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia Campus Patos de Minas como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Prof. Dra. Enyara Rezende Moraes – IBTEC - UFU
Presidente


Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte – IBTEC - UFU
Membro


Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes - IQUFU - UFU
Membro

Patos de Minas – MG, 06 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sempre me abençoar e iluminar meu caminho me dando sabedoria e discernimento para seguir em frente com meus estudos.

A meus pais **Marly** e **José Carlos** e minhas irmãs **Franciély** e **Isabela**, por sempre me apoiarem e me darem forças para nunca desistir dos meus sonhos frente às dificuldades.

Às minhas avós **Francisca** e **Otavina**, por ficarem tão felizes de estar estudando em uma federal e por todo apoio emocional.

Ao meu namorado **Hudier**, por sempre me apoiar em tudo, ser meu melhor amigo, companheiro e por sempre fazer de mim uma pessoa melhor.

À Profa, Dra. **Enyara Rezende Moraes**, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por todos os excelentes conhecimentos passados e por toda confiança depositada para que a realização desse trabalho fosse um sucesso.

Ao Prof, Dr. **Marcos de Souza Gomes**, por todo conhecimento, bondade e ajuda passados para a realização desse trabalho.

Ao meu coorientador, **Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz**, por todo conhecimento repassado e ajuda.

Aos técnicos de laboratório, **Renan Faria** e **Carla Lima**, por serem tão educados e por sempre me ajudarem em meus experimentos.

Às minhas amigas **Danúbia** e **Dara**, por sempre darem conselhos em minha vida, pelos muitos anos de amizade, risadas, encontros e apoio emocional.

À minha amiga de curso, **Fernanda Farisco**, por toda ajuda e apoio para a realização e desse trabalho.

A todos que contribuíram para que mais uma etapa do curso e também da minha vida fosse concluída com sucesso, só tenho a agradecer por mais esse momento, que é tão especial para mim!

RESUMO

Caryocar brasiliense (Pequi) é uma planta do Cerrado amplamente utilizada na medicina tradicional. A análise fitoquímica de espécies vegetais é importante para conhecer seus metabólitos secundários que podem ser efetivos na terapêutica de diferentes patologias. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de compostos fenólicos totais, flavonoides, antocianinas e dosar a atividade antioxidante nos extratos brutos metanólico das folhas e etanólico da casca. Os extratos foram preparados por meio de banho ultrassônico ou agitação magnética. Para a folha utilizou-se o solvente metanol 100% e para a casca etanol 96%. A dosagem de compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, flavonoides e antocianinas pelo método descrito por Lees e Francis. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH. A folha apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do que a casca, para ambos os métodos de extração. Considerando o teor de antocianinas, tanto no extrato bruto das folhas quanto da casca, não houve diferença estatística significativa entre eles ($p < 0,05$), exceto para a casca de pequi por agitação magnética. Observou-se que a folha de pequi por banho ultrassônico apresentou a maior atividade antioxidante nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com valores respectivamente, de 15%, 32,4% e 72,2%. Tais resultados podem ser explicados pela considerável concentração de fenólicos totais nas folhas de pequi, os quais possuem grande capacidade de doar elétrons ao radical DPPH e estabilizá-lo. Portanto, essa espécie apresenta compostos antioxidantes que podem sequestrar radicais livres em condições *in vitro*.

Palavras-chave: Produtos naturais. Cultura popular. Bioma. Fármacos. Métodos de extração.

ABSTRACT

Caryocar brasiliense, popularly known as *Pequi*, is a Cerrado plant widely used in traditional medicine. A phytochemical analysis of plant species is important to know their secondary metabolites that can be effective in the treatment of different pathologies. The aim of the present study was to evaluate the presence of total phenolic compounds, total anthocyanins and flavonoids and to analyze the antioxidant activity in the raw extracts of *Pequi* leaves and bark. The extracts were prepared from leaves and bark by extraction by ultrasonic bath or magnetic stirring. For a used sheet or 100% methanol solvent and for a 96% ethanol shell. Phenolic compounds were measured by the Folin-Ciocalteu method, anthocyanins and flavonoids by the method described by Lees and Francis. An antioxidant activity was evaluated by the DPPH method. One leaf shows the highest content of phenolic compounds and total flavonoids than the bark for both extraction methods. Allocating anthocyanin content, both crude leaf extract and bark), there was no statistically significant difference between them ($p < 0.05$), except for the (CAP). We observed that the leaf (FUP) has the highest antioxidant activity in the variations of 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, with values of 15%, 32.4% and 72.2% respectively. These results can be explained by the concentration of total phenolics in *pequi* leaves, which have great capacity to donate electrons to the radical DPPH and stabilize it. Therefore, this species has antioxidant compounds that can sequester free radicals under in vitro conditions.

Key words: Natural products. Popular culture. Biome. Drugs. Extraction methods.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Br: Brasil

IBTEC: Instituto de Biotecnologia

nm: nanômetro

mg EAG: miligramas de equivalentes de ácido gálico

FAP: extrato bruto da folha de pequi por agitação magnética

FUP: extrato bruto da folha de pequi por banho ultrassônico

CAP: extrato bruto da casca de pequi por agitação magnética

CUP: extrato bruto da casca de pequi por banho ultrassônico

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

µg: micrograma

BHT: 2,6-ditertbutil-4-metilfenol

µl: microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de substâncias redutoras com reagente de Folin Ciocalteu	16
Figura 2. Teor de compostos fenólicos totais utilizando os extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi	17
Figura 3. Estrutura química dos flavonoides	19
Figura 4. Teor de flavonoides totais utilizando os extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi.....	19
Figura 5. Estrutura química das antocianinas.....	21
Figura 6. Teor de antocianinas totais utilizando os extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi.....	21
Figura 7. Esquema geral da reação do ensaio de DPPH.....	23
Figura 8. Ilustração do meio reacional durante o ensaio de DPPH dos extratos metanólicos FAP e FUP.....	23
Figura 9. Ilustração do meio reacional durante o ensaio de DPPH dos extratos metanólicos CAP e CUP.....	24
Figura 10. Atividade antioxidante dos extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi pelo método DPPH.....	24
Figura 11. Gráfico biplot PC1 X PC2 mostrando a correlação entre os grupos	27
Figura 12. Dendograma dos quatro extratos estudados em relação ao perfil fitoquímico.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
REFERENCIAL TEÓRICO	10
1.1 Plantas do Cerrado	10
1.2 Atividade antioxidante das plantas do Cerrado	11
1.3 Compostos fenólicos das plantas do Cerrado	12
OBJETIVO	12
Objetivo geral	13
Objetivos específicos	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Obtenção do material vegetal	13
2.2 Preparação dos extratos etanólico e metanólico	13
2.3 Determinação do teor de fenólicos totais	14
2.4 Avaliação de flavonoides totais	14
2.5 Avaliação de antocianinas	15
2.6 Método DPPH	15
2.7 Análise estatística	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1 Determinação do teor de fenólicos totais	16
3.2 Determinação do teor de flavonoides totais	18
3.3 Determinação do teor de antocianinas	20
3.4 Análise da atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH	22
3.5 Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)	26
4 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, infecções fúngicas têm sido uma importante ameaça clínica, com significativa morbidade e mortalidades associadas que são devidos principalmente ao desenvolvimento de multirresistência frente aos antimicrobianos disponíveis na terapêutica.

Desse modo, o estudo de plantas medicinais é importante por possibilitar a descoberta de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos. O Cerrado possui uma área imensa com diversas plantas que ainda precisam ser mais exploradas, por possuírem grande potencial de aplicabilidade terapêutica.

Caryocar brasiliense pertence à família *Caryocaraceae*, é uma planta do Cerrado popularmente conhecida como Pequi. Seu fruto é bastante consumido na região, sendo também utilizado para a fabricação de óleos comestíveis para o combate de fungos e bactérias, além disso ele é rico em vitaminas A, C e E. O Pequi possui inúmeros benefícios para a saúde humana e vem trazendo resultados satisfatórios para a área farmacêutica e bioquímica, tendo um forte potencial fitoterápico para a medicina popular.

Assim, a busca por compostos químicos através dos metabólitos secundários como os fenólicos, flavonoides, antocianinas e antioxidantes torna-se uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas que atuem contra diversas patologias.

Portanto, conhecendo-se o potencial demonstrado pelos compostos naturais e da importância da descoberta de novas drogas, faz-se necessário a avaliação do perfil fitoquímico de extratos vegetais de plantas medicinais do bioma Cerrado objetivando futuramente a descoberta de novos fármacos.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Plantas do Cerrado

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana, o conhecimento popular tem grande contribuição para a divulgação das propriedades terapêuticas obtidas a partir do uso dessas plantas. Recentemente, surgiram estudos que indicam a existência de plantas do Cerrado com inúmeras atividades antimicrobianas e, entre elas, ação fungicida. O Cerrado, com sua alta biodiversidade e 44% da flora endêmica permite buscas promissoras por substâncias vegetais com atividade antimicrobianas, nematicidas, bactericidas e fungicidas. Os extratos e óleos essenciais

extraídos de plantas têm grande potencial no controle de microrganismos patogênicos, e muitos deles ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, além da capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas nas plantas nos casos de fungos fitopatogênicos (CHAVES, 2018).

Nas últimas três décadas, o Cerrado tem passado por um processo de transformação contínua, que tem afetado a dinâmica deste importante ecossistema brasileiro. O Cerrado ocupa a porção central do território brasileiro, onde se localiza a maior parte da população brasileira, bem como, os estados mais industrializados e com forte vocação para agricultura e pecuária. Com a expansão da agropecuária, o Cerrado deu lugar a pastagens, plantações de cereais e monoculturas, com a finalidade de abastecer o grande mercado consumidor brasileiro e também a exportação de produtos agrícolas. O Brasil é conhecido como o celeiro do mundo, devido a sua grande área agricultável (NUNES; TRALDI, 2019).

A espécie *C. brasiliense*, tem sido relatada por possuir atividade antifúngica. O óleo comestível das sementes desta planta mostra bioatividade em testes de suscetibilidade *in vitro* sobre isolados de *Cryptococcus. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (PASSOS et al., 2002).

1.2 Atividade antioxidante das plantas do Cerrado

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam a ação de radicais livres e danos ao nosso organismo. O termo antioxidante significa que impede a oxidação de outras substâncias químicas, que ocorrem nas reações metabólicas ou por fatores exógenos, como as radiações ionizantes. São obtidos pelos alimentos, sendo encontrados na sua maioria nos vegetais, o que explica a ação saudável que as frutas, legumes, hortaliças e cereais integrais exercem sobre o organismo (OS ANTIOXIDANTES..., 2009).

Devido à necessidade de proteção contra os radicais livres, gerados pela exposição aos raios solares e ao oxigênio, as plantas concentram uma grande diversidade de antioxidantes, podendo ser consideradas uma importante fonte desses compostos. Nas indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticos, o interesse pela pesquisa sobre novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos. Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas, tais como sementes, frutos, folhas, raízes e nas especiarias (GUIMARÃES, 2016).

A polpa do pequi contém uma boa quantidade de óleo comestível e é rico em vitamina A e proteínas, transformando-se em importante complemento alimentar. Como uso medicinal, o óleo da polpa tem efeito tonificante, sendo usado contra bronquites, gripes e resfriados e no controle de tumores. O chá das folhas é tido como regulador do fluxo menstrual (ROESLER et al., 2007).

1.3 Compostos fenólicos das plantas do Cerrado

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras como prótons e elétrons e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Os compostos fenólicos têm recebido crescente interesse nos últimos anos, uma vez que são encontrados em grande quantidade em plantas e que o consumo de vegetais ou bebidas ricas nos mesmos pode reduzir o risco de várias doenças devido, entre outras, a sua atividade antioxidante. Assim vários estudos têm analisado o potencial antioxidante de uma variedade de alimentos. Como consequência apareceram vários ensaios para avaliação do mesmo *in vitro* em diferentes amostras como vinho, frutas e outros vegetais (GIADA, 2006).

Em solos ácidos, devido a uma redução na taxa de conversão de amônio a nitrato, a incorporação de nitrogênio pode ser inibida, o que tem sido utilizado para explicar estudos que constatarem altos níveis de produção de metabólitos secundários (especialmente compostos fenólicos) associados a plantas crescendo nesse tipo de solo. Os níveis de fósforo e potássio, apesar de relativamente pouco estudados, também podem ter efeitos na produção de metabólitos nitrogenados (NETO; LOPES, 2006).

OBJETIVO

Objetivo geral

Realizar a análise fitoquímica dos extratos brutos das folhas e cascas da espécie vegetal do Cerrado *Caryocar brasiliense*.

Objetivos específicos

- Realizar os dois métodos de extração, agitação magnética e banho ultrassônico;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais dos extratos metanólico para folha e etanólico para casca;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos metanólico para folha e etanólico para casca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *C. brasiliense* foram coletadas manualmente e a casca foi coletada com um auxílio de facão. Os materiais vegetais da espécie selecionada foram coletados no mês de agosto de 2016 em uma fazenda na BR 354, próximo à Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil, a 46° 39' 57.881" Norte; 18° 35' 30.433" Oeste. A fazenda está localizada a 12 km de Patos de Minas e o tipo fisionômico predominante é o Cerrado.

A identificação do material vegetal coletado foi realizada pela professora especialista em botânica do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Dra. Terezinha Aparecida Teixeira. Após a coleta e obtenção dos materiais vegetais, estes foram lavados em água, para a retirada de impurezas, e em seguida foram armazenados em ultra freezer a uma temperatura de -80°C. Para a produção dos extratos brutos, os vegetais foram retirados do ultra freezer e colocados rapidamente para dessecar em liofilizador (modelo Liotop/L101) por um período de 72 horas, em seguida foram trituradas em moinho de facas tipo Willye (modelo Star FT-50) até o estado de pó fino.

2.2 Preparação dos extratos etanólico e metanólico

Para a preparação dos extratos foram feitos dois métodos: sendo o primeiro por banho ultrassônico e o segundo por agitação magnética. O pó obtido das folhas e cascas foram pesados duas vezes, obtendo-se a quantidade de 4 g para cada. Para o primeiro método, os pós foram colocados em um Erlenmeyer de 250 mL e colocados os respectivos solventes, para a folha de pequi foi utilizado o metanol 100% e para a casca foi o etanol 96%, sendo a quantidade de 200 mL para cada. Em seguida, foram levados para o banho ultrassônico durante 15 min, depois foram retirados e deixados em descanso por 5 min, sendo esse procedimento feito 3 vezes e por fim foi colocado papel filme nos Erlenmeyers para que a luz não degrade os compostos presentes no extrato e levados até a geladeira. Para o segundo método os pós foram colocados em frascos âmbar de 500 mL, adicionando-se 200 mL de solvente e levando-os em agitador magnético durante 24 h. Feito os dois métodos, ambos extratos foram filtrados a vácuo em um Kitasato e rotaevaporados. Como os extratos ficaram aquosos, os mesmos foram levados para o liofilizador durante 72 h e depois colocados em tubos Falcon de 50 mL e guardados no armário.

2.3 Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 0,1 mL da amostra diluída (50 g L^{-1}) com 0,5 mL de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente 0,4 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L^{-1}) foi adicionado à mistura reacional. As leituras de absorbância foram realizadas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente durante 2 h. O ácido gálico (250 mg/mL^{-1}) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de FAP, FUP, CAP e CUP de material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.4 Avaliação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Lees e Francis (1972), seguidas de pequenas modificações. Foi preparada a solução extratora, adicionando 15 mL de HCl $1,5 \text{ mol/L}$ diluído e 85 mL de etanol 96% em uma proveta de 100 mL. Foi feita a diluição de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em triplicata adicionando 12 μL da

amostra e 2988 µL da solução extratora em béquers, foi deixado *over night* (12 horas no escuro) e por fim realizada a absorbância a 374 nm.

2.5 Avaliação de antocianinas

O teor de antocianinas totais foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Lees e Francis (1972), seguidas de pequenas modificações. Foi preparada a solução extratora, adicionando 15 mL de HCl 1,5 mol/L diluído e 85 mL de etanol 96% em uma proveta de 100 mL. Foi feita a diluição de 1000 µg mL⁻¹ em triplicata adicionando 12 µL da amostra e 2988 µL da solução extratora em béquers, foi deixado *over night* (12 horas no escuro) e por fim realizada a absorbância a 535 nm.

2.6 Método DPPH

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia de Lopes-Lutz et al, (2008) seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 µg mL⁻¹. Para a avaliação, 0,9 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,1 mL de cada diluição do extrato metanólico e etanólico em µg mL⁻¹. Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Após 60 min, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{Amo} = Absorbância do DPPH com a amostra.

A_{CN} = Absorbância do DPPH com o etanol.

2.7 Análise estatística

Os resultados para as características avaliadas (compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais), assim como a atividade antioxidante pelo método de DPPH, foram feitas análises de variância, seguida pelo teste F, para verificar a existência de diferença

entre as amostras, de acordo com a aplicação de cada metodologia utilizada. As análises foram realizadas utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras e o software empregado foi o Graph Pad Prism versão 5.01. Considerando os resultados obtidos e a necessidade de correlacioná-los e agrupá-los, a análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) foram utilizadas.

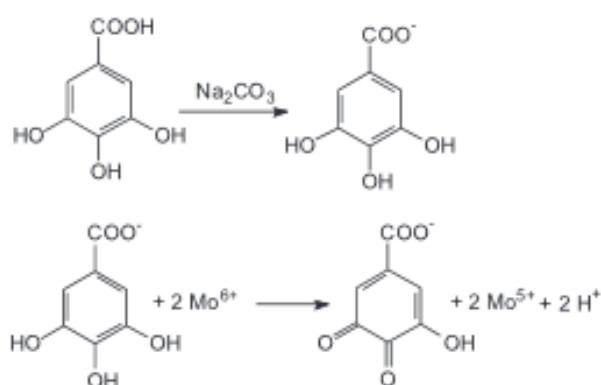
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do teor de fenólicos totais

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos, eles estão presentes também nos vegetais, fazendo parte do metabolismo secundário dos mesmos e tendo grande importância para a área farmacológica, medicinal e antifúngica (PRAIA et al., 2014).

O método Folin-Ciocalteu se baseia na redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, presentes no reagente, pelos compostos fenólicos presentes na amostra na forma de óxido de tungstênio e óxido de molibdênio em meio alcalino (**Figura 1**) (ALVES et al., 2014).

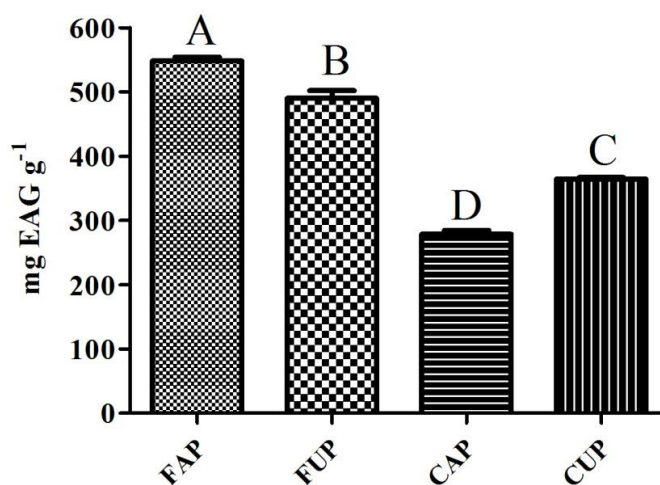
Figura 1. Reação de substâncias redutoras com reagente de Folin – Ciocalteu. O ácido gálico em condição alcalina reage com o complexo fosfomolibdico do reagente Folin – Ciocalteu. Na reação há uma mudança de cor, indicando que houve redução do composto fosfomolibdico, passando da coloração amarelada para a azulada.



Fonte: (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009)

Os resultados obtidos na determinação dos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como miligramas equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal, estão apresentados na (Figura 2).

Figura 2. Teor de compostos fenólicos totais utilizando os extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FAP: Folha pequi por agitação magnética. FUP: Folha pequi por banho ultrassônico. CAP: Casca pequi por agitação magnética. CUP: Casca pequi por banho ultrassônico.



Através da análise estatística utilizando-se o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) observou-se que a folha de pequi apresentou maior teor de compostos fenólicos em relação a casca para ambos os métodos de extração, sugerindo um alto teor de compostos fenólicos totais, como taninos, flavonoides e antocianinas nas folhas dessa espécie.

Nota-se neste estudo que a folha de pequi pelo método de agitação magnética, apresentou maior teor de fenólicos totais (547,87 mg EAG g⁻¹), em relação a quantidade obtida pelo banho ultrassônico (490,18 mg EAG g⁻¹). Por outro lado, houve uma diferença significativa, com valores mais expressivos de fenólicos totais obtidos pela casca de pequi pelo método ultrassônico (364,72 mg EAG g⁻¹), em relação a casca utilizando agitação magnética (278,46 mg EAG g⁻¹).

Conforme Sarker; Latif e Gray (2006) o banho ultrassônico é um método de maceração modificado em que a extração é facilitada através dos pulsos de frequência. O ultrassom é usado para induzir um estresse mecânico nas células através da produção de cavitações na amostra. A quebra celular aumenta a solubilização de metabólitos no solvente e melhora a extração. Por outro lado, a agitação magnética é usada para garantir uma mistura

homogênea, podendo aumentar a velocidade da extração, a mesma acaba quando um equilíbrio é alcançado entre a concentração de metabólitos no extrato e a quantidade no material vegetal.

Observou-se por meio dos resultados que o FAP se mostrou melhor que FUP (a agitação magnética foi mais eficiente para a extração das folhas), o que pode ter acontecido como explicado anteriormente, a agitação magnética promove uma mistura homogênea e com velocidade maior para a extração. No entanto, CUP se mostrou melhor que CAP (o banho ultrassônico foi mais eficiente para a extração da casca).

Comparando-se os resultados desse estudo com a literatura, Baeta (2013) avaliou os compostos fenólicos presentes na polpa de pequi por 4 tipos de armazenamento, sendo eles: *in natura*, conserva, *in natura* liofilizada e conserva liofilizada, utilizando dois solventes para extração: aquoso e metanólico. Todos os extratos quantificados apresentaram teores de compostos fenólicos, sendo que o menor foi obtido no extrato aquoso da polpa em conserva (19,31 mg EAG g⁻¹) e o maior no extrato etanólico da polpa *in natura* liofilizada (92,44 mg EAG g⁻¹), podendo comprovar que a extração etanólica, neste caso, é a mais eficiente. Nota-se diferença entre as polpas estudadas, verificando uma diminuição do teor de compostos fenólicos na polpa em conserva, porém com o teor obtido pode-se considerá-la um alimento com capacidade antioxidante.

Comparando-se os resultados desse estudo com a literatura, Macedo et al (2007) os resultados das análises desenvolvidas em folha, casca e caule de *S. adstringens* evidenciaram que a folha apresenta maior teor de compostos fenólicos seguidos de casca e caule. Os valores encontrados demonstram que as folhas podem ser utilizadas como matéria prima para extração de compostos fenólicos principalmente, no que se refere aos flavonoides e taninos.

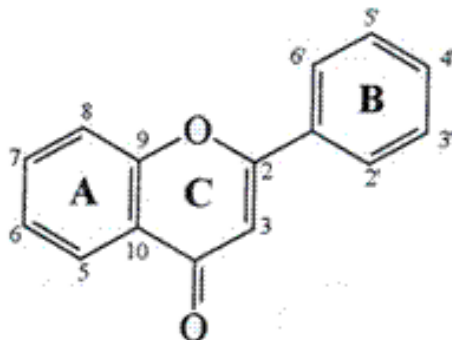
3.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Os flavonoides são compostos fenólicos encontrados em diversos alimentos do reino vegetal, como maçã, repolho, uva, cebola, brócolis, chicória, aipo, chá, soja e cacau. Os flavonoides possuem várias atividades biológicas, como ação anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana, antialérgica e vasodilatadora, e estão associados à prevenção de doenças crônicas, como o câncer e as doenças cardiovasculares (OLIVEIRA, V. P; ESPESCHIT; PELUZIO, 2019).

A grande maioria desses compostos possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas,

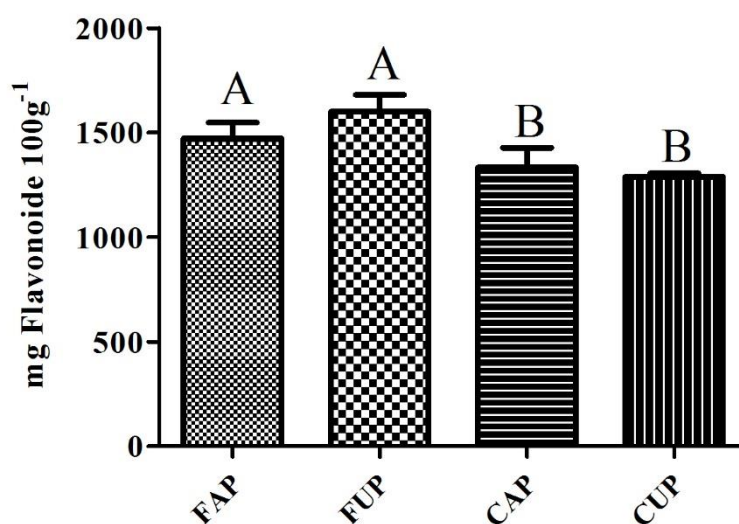
apresentando um núcleo característico C6-C3-C6. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (REGINATO; SILVA; BAUERMANN, 2015) (**Figura 3**).

Figura 3. Estrutura química dos flavonoides.



Fonte: (REGINATO; SILVA; BAUERMANN, 2015)

Figura 4. Teor de flavonoides totais utilizando os extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. FAP: Folha pequi por agitação magnética. FUP: Folha pequi por banho ultrassônico. CAP: Casca pequi por agitação magnética. CUP: Casca pequi por banho ultrassônico.



Através do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) observou-se que os extratos da folha de Pequi (FAP e FUP) foram os que apresentaram os maiores teores de flavonoides totais com valores de 1473,5 mg 100 g⁻¹ e 1600 mg 100 g⁻¹, respectivamente, não havendo diferença estatística significativa entre eles (**Figura 4**). Por outro lado, os extratos da casca de Pequi (CAP e

CUP), demonstraram menores valores de flavonoides totais, com resultados respectivamente, 1334 mg/100 g⁻¹ e 1283 mg/100 g⁻¹, ambos com valores estatisticamente semelhantes.

Condizendo com o que foi encontrado em nosso estudo, nas folhas de *Caryocar brasiliense* há elevada quantidade de compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, que apresentam grande interesse farmacológico. Já foram atribuídas propriedades antiespasmódica, anti-inflamatória, antialérgica, antiulcerogênica, antiviral, dentre outras a diversos flavonoides. É dedicada atenção especial aos produtos que possam agir como antioxidantes, ou seja, que combatam o estresse oxidativo, coadjuvante no tratamento de diversas doenças infecciosas e/ou inflamatórias. Nesse contexto, os compostos fenólicos presentes na folha do pequi são incluídos na categoria de bloqueadores de radicais livres, sendo normalmente empregados como antioxidantes, podendo ser efetivos em reduzir danos oxidativos nos seres humanos, os quais estão envolvidos na gênese ou desenvolvimento de várias doenças via estresse oxidativo (CARVALHO; PEREIRA; ARAÚJO, 2015).

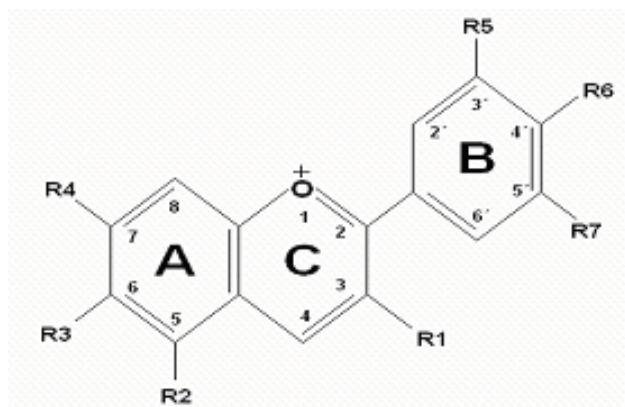
Comparando-se os resultados desse estudo com a literatura, Savi et al. (2017), avaliou o teor de flavonoides de algumas frutas e hortaliças. A cebola orgânica apresentou maiores teores de flavonoides (11,8 mg 100 g⁻¹) em relação à cebola convencional (10 mg 100 g⁻¹). Fato que pode ser justificado pelo não emprego de agrotóxicos no cultivo. Dessa maneira, produz concentrações superiores de compostos fenólicos, que atuam como agentes de defesa contra insetos, microrganismos, bactérias e fungos.

3.3 Determinação do teor de antocianinas

As antocianinas (das palavras gregas *anthos*, flor e *kianos*, azul), são pigmentos vegetais, responsáveis por uma grande variedade de cores observadas em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas, que podem variar do vermelho vivo ao violeta/azul. Quimicamente, esses pigmentos são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides, grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. (CASTAÑEDA, 2009).

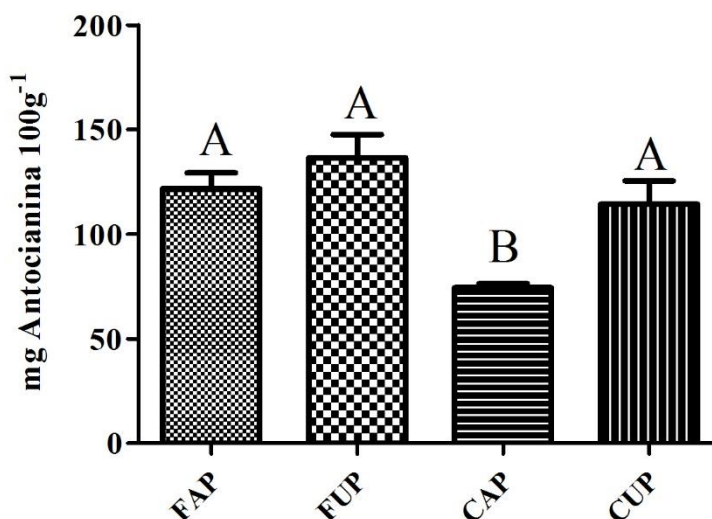
A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de 15 carbonos (LOPES et al., 2005) (**Figura 5**).

Figura 5. Estrutura química das antocianinas.



Fonte: (LOPES et al., 2005)

Figura 6. Teor de antocianinas totais utilizando os extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FAP: Folha pequi por agitação magnética. FUP: Folha pequi por banho ultrassônico. CAP: Casca pequi por agitação magnética. CUP: Casca pequi por banho ultrassônico.



Através do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) observou-se que os extratos da folha e casca de Pequi (FAP, FUP e CUP) foram os que apresentaram os maiores teores de antocianinas totais com valores de $132 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, $112 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e $121,8 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ respectivamente, não havendo diferença estatística significativa entre eles (**Figura 6**).

Por outro lado, o extrato da casca de pequi (CAP) com o valor de $78,4 \text{ mg}/100 \text{ g}^{-1}$ foi o que apresentou menor teor de antocianinas totais. Em relação a isso, o CAP demonstrou

também nesse estudo, a menor concentração de compostos fenólicos (278,46 mg EAG g⁻¹) entre os extratos analisados, isso explica, os menores valores encontrados para antocianinas totais, já que essas substâncias são quimicamente pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos.

Comparando-se esses resultados com a da literatura, Abe et al (2007) avaliou o teor de antocianinas de variedades de *Vitis vinifera* e encontrou valores que variam de 8 a 191 mg/100 g⁻¹. As antocianinas apresentam capacidade antioxidante superior a outros fenólicos presentes nas uvas, já que a correlação entre antocianinas e capacidade antioxidante foi superior à correlação entre fenólicos totais e capacidade antioxidante ($r = 0,81$).

3.4 Análise da atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, quando ocorre a produção excessiva de radicais de oxigênio durante processos fisiopatológicos ou devido a fatores ambientais. Através de um ou mais mecanismos, os antioxidantes têm como função reduzir a oxidação, como por exemplo, por meio da inibição de radicais livres e complexação de metais. Há um grande interesse pelos antioxidantes naturais vindos de extratos vegetais, principalmente a partir de plantas aromáticas e medicinais consideradas fontes de antioxidantes naturais (SILVA et al., 2018).

O importante papel dos antioxidantes no combate aos danos provocados pelos radicais livres tem conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante de variadas substâncias. Dentre os inúmeros métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* ou *in vivo*, um dos mais utilizados é o DPPH, método colorimétrico baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (RUFINO et al., 2007).

O método baseia-se na transferência de elétrons e prótons onde, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada por espectrofotometria (**Figura 7**) (PIRES et al., 2017).

Figura 7. Esquema geral da reação do ensaio de DPPH. A solução do radical DPPH, de coloração roxa, é reduzida por antioxidantes contidos no extrato vegetal, modificando a coloração da solução de roxo para amarelo.



Fonte: (PEREIRA, 2010)

Figura 8. Ilustração do meio reacional durante o ensaio de DPPH dos extratos metanólicos FAP e FUP. As cores roxas indicam os extratos nas concentrações mais baixas, como 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as cores mais amareladas indicam os extratos nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Setas pretas: controles negativos. Setas azuis: extratos nas concentrações 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Setas amarelas: extratos nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. FAP: Folha pequi por agitação magnética. FUP: Folha pequi por banho ultrassônico.



Figura 9. Ilustração do meio reacional durante o ensaio de DPPH dos extratos etanólicos CAP e CUP. As cores roxas indicam os extratos nas concentrações mais baixas, como 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as cores mais amareladas indicam os extratos nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Setas pretas: controles negativos. Setas azuis: extratos nas concentrações 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Setas amarelas: extratos nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. CAP: Casca pequi por agitação magnética. CUP: Casca pequi por banho ultrassônico.

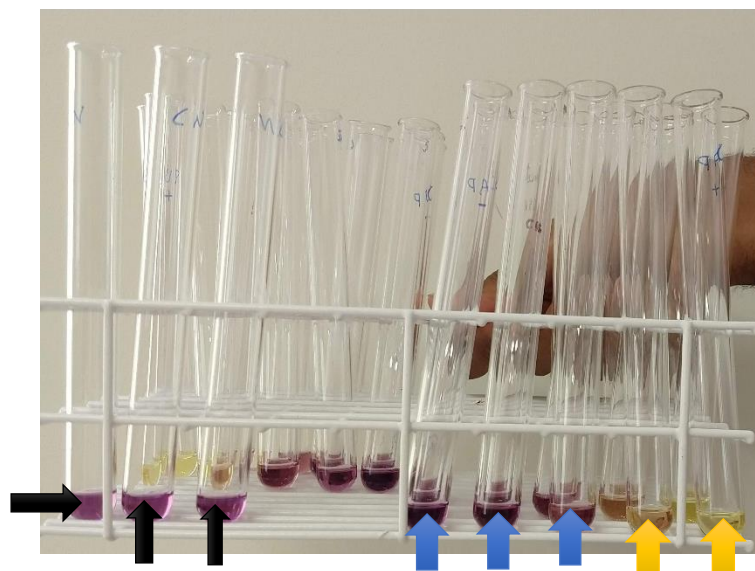
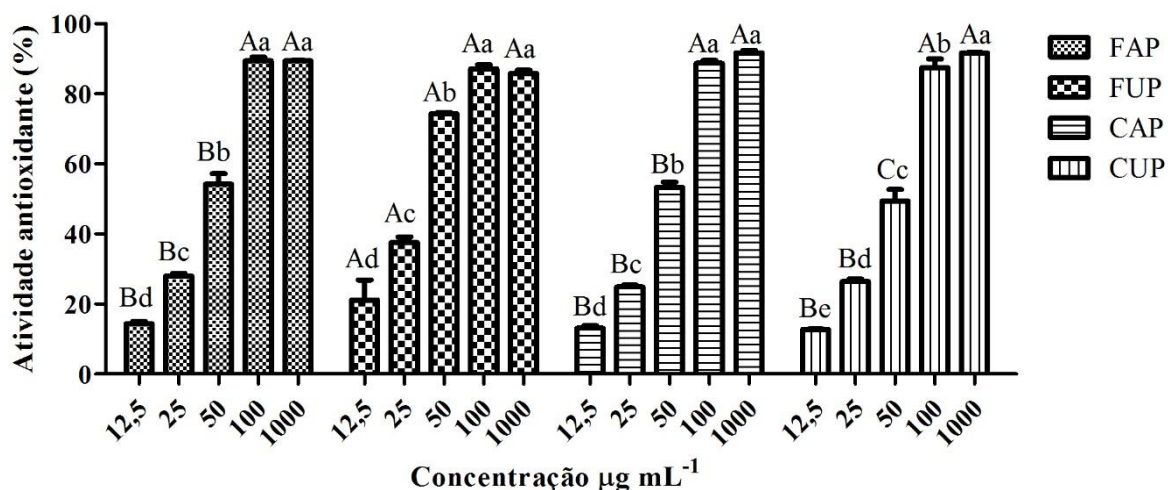


Figura 10. Atividade antioxidante dos extratos metanólico para folha e etanólico para casca de Pequi pelo método DPPH. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FAP: Folha pequi por agitação magnética. FUP: Folha pequi por banho ultrassônico. CAP: Casca pequi por agitação magnética. CUP: Casca pequi por banho ultrassônico.



Os dados demonstram que a atividade antioxidante para a concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram estatisticamente iguais na maioria das amostras, mostrando que a

partir da concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ocorreu uma máxima atividade, devido à saturação de antioxidantes na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Observa-se que houve atividade antioxidante dos extratos testados e que o percentual antioxidante é dose-dependente a partir da concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, a medida que aumenta a concentração se obtém uma maior ação antioxidante. Através da análise estatística utilizando-se o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) observou-se que o FUP apresentou a maior atividade antioxidante nas concentrações de 12,5, 25 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, com valores respectivamente, de 15%, 32,4% e 72,2%. Tais resultados podem ser explicados pela considerável concentração de fenólicos totais na folha de pequi, os quais possuem grande capacidade de doar elétrons ao radical DPPH e estabilizá-lo. Enquanto que os extratos da casca de pequi (CAP e CUP), obtiveram uma menor atividade antioxidante provavelmente pela presença de substâncias com menor poder redutor (**Figura 10**).

Comparando-se os resultados desse estudo com a literatura, foram avaliados por Porto (2008) 6 tipos de solvente de extração na recuperação da atividade antioxidante em folhas e frutos do pequi (mesocarpo e polpa). Nas três partes analisadas, as maiores atividades antioxidantes foram obtidas pelos extratos etanólicos (98,03%), metanólicos (97,68%) e aquoso (96,91%). Nos extratos a base de hexano, clorofórmio e acetato de etila os valores observados foram, respectivamente de 2,60%, 42% e 57,87%. Observa-se que existe uma tendência de que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior é a atividade antioxidante do extrato. Este resultado destaca a importância de solventes polares na extração de antioxidantes, bem como é um indicativo da natureza mais polar dos constituintes de extratos do pequi com ação antioxidante.

Os antioxidantes (polifenóis) agem neutralizando a ação dos radicais livres e atuam, em diferentes níveis tais como, na proteção do organismo, impedindo a formação dos radicais livres, principalmente por meio da inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Têm capacidade de inativar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, eliminando alterações nos lipídeos, aminoácidos e bases do DNA, além disso, são importantes componentes para evitar doenças cardiovasculares e câncer (BRAZACA, 2007).

Correlacionando com a forte ação antioxidante obtida neste trabalho, através do método DPPH, pelo extrato das folhas de Pequi, Sonal e colaboradores (2012) propuseram que os compostos fenólicos e flavonoides podem ser responsáveis diretamente pela capacidade de sequestro de radicais livres no extrato. Os compostos fenólicos e flavonoides atuam como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons,

quelantes de metais, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação.

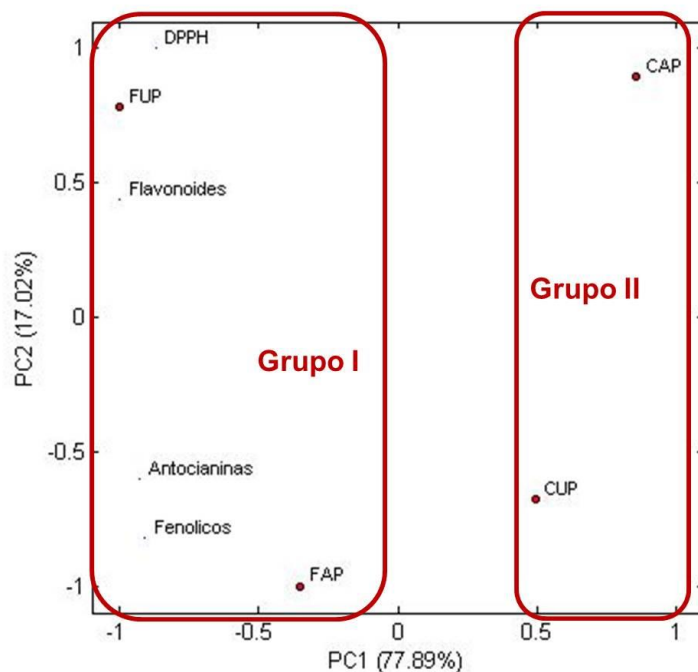
3.5 Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)

Na busca por correlação dos dados encontrados, foi realizado um estudo estatístico utilizando a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). Assim, objetivou-se correlacionar e agrupar os resultados da análise fitoquímica com a parte da planta utilizada e método de extração utilizado.

A PCA mostrou que com a primeira e segunda componente principal foi possível descrever 94,91% dos dados, sendo 77,89% da variância total descrita pela primeira componente.

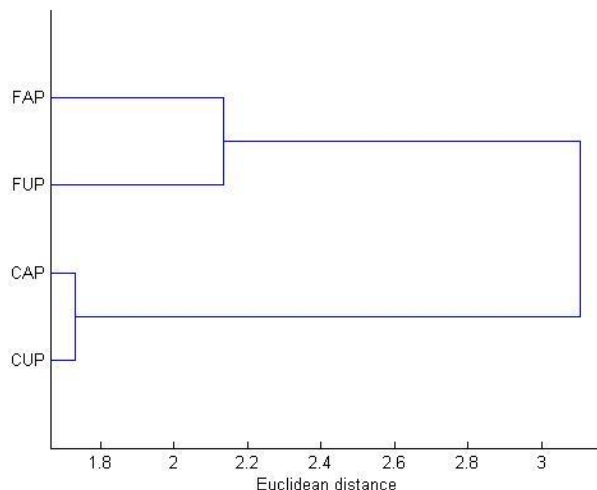
A análise dos dados pela técnica de PCA permitiu agrupar os resultados de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças (**Figura 11**) obtendo 2 grupos. A análise do gráfico de escores mostra a separação em dois grupos, I e II. O grupo I agrupou FAP e FUP, sendo que FUP está mais correlacionado com DPPH e flavonoides, enquanto FAP com antocianinas e compostos fenólicos. O grupo II agrupou CAP e CUP, sendo que CAP correlaciona melhor com DPPH e flavonoides, enquanto CUP apresenta maior correlação com antocianinas e compostos fenólicos.

Figura 11. Gráfico biplot PC1 X PC2 mostrando a correlação entre os grupos. FAP: Folha pequi por agitação magnética. FUP: Folha pequi por banho ultrassônico. CAP: Casca pequi por agitação magnética. CUP: Casca pequi por banho ultrassônico.



O dendograma (**Figura 12**) para os extratos brutos e análises fitoquímicas estudadas no presente trabalho corrobora com os resultados apresentados na Figura 11. Evidencia-se o agrupamento existente entre os extratos brutos das folhas (FAP e FUP) e entre os extratos brutos da casca (CAP e CUP). Isso significa que os extratos brutos das folhas, produzidos tanto por agitação magnética quanto por banho ultrassônico, apresentam teores dos compostos estudados assim como atividade antioxidante superior aos encontrados nos extratos brutos da casca. Portanto, considerando as partes utilizadas da planta e os métodos de extração, é possível, através destas análises estatísticas, dizer que os extratos das folhas são mais promissores para investigações posteriores de uso terapêutico.

Figura 12. Dendograma dos quatro extratos estudados em relação ao perfil fitoquímico. FAP: Folha pequi por agitação magnética. FUP: Folha pequi por banho ultrassônico. CAP: Casca pequi por agitação magnética. CUP: Casca pequi por banho ultrassônico.



4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que o maior teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais foi verificado para o extrato das folhas de Pequi, sendo assim, esta planta pode ser apontada como boa fonte de antioxidantes naturais.

O extrato das folhas de Pequi demonstrou maior potencial antioxidante em condições *in vitro* do que o extrato da casca desta espécie vegetal. E neste sentido o extrato foliar possui características que viabilizam futuros estudos sobre seus constituintes bioativos, que possa ter aplicabilidade tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica.

A eficiência do método de extração é relativa, ou seja, depende de qual amostra foi utilizada, se for utilizado folhas a agitação magnética se mostra mais eficiente e se for utilizado casca o banho ultrassônico garante uma melhor extração.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T et al. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L.**, Campinas, p. 394-400, abr/jun 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n2/31.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2019.
- ALVES, I. A. B. S et al. **Desenvolvimento de validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl**, Viçosa, v. 39, n. 1, p. 37-47, nov 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v39n1/0100-6762-rarv-39-01-0037.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.
- BAETA, Danielle dos Santos. **Avaliação de características físico-químicas e bioquímicas do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) em suas diversas formas de armazenamento**. Dissertação – Mestrado, Araraquara, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88020/000721762_20151231.pdf?sequence=1>. Acesso em: 01 nov. 2019.
- BRAZACA, S. C. G. **Antioxidantes previnem doenças e envelhecimento**, n. 7, jan/jun 2007. Disponível em: <<https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va07-qualidade01.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2019.
- CARVALHO, L.S; PEREIRA, K. F; ARAÚJO, E. G. **Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*)**, Umuarama, v. 19, n. 2, p. 147-157, mai/ago 2015. Disponível em: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&ei=qY7EXfy4Ary-5OUPhNifgAw&q=avalia%C3%A7%C3%A3o+de+flavon%C3%B3ides+em+pequi&oq=avalia%C3%A7%C3%A3o+de+flavon%C3%B3ides+em+pequi&gs_l=psy-ab.3..33i160l2.5093.11645..12167...0.2..0.156.4417.7j32.....0....1..gws-wiz.....0i71j0i22i30j33i21j33i22i29i30.7zeQR2pGw6w&ved=0ahUKEwi8scvOh9nlAhU8H7kGHQTSB8AQ4dUDCAo&uact=5>. Acesso em: 05 nov. 2019.
- CASTAÑEDA, L. M. F. **Antocianinas: O que são? Onde estão? Como atuam?**. 2009. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/agronomia/materiais/userfiles/Leticia.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2019.
- CHAVES, M. R. V et al. **Potencial fungicida de plantas medicinais do Cerrado da Costa Leste do estado de Mato Grosso do Sul**, Três Lagoas, v. 6, n. 1, p. 81-70, jan/jul 2018. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/2558/96198655ded0454e1c1fd6e2264607f73ec7.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.
- DOSSIÊ ANTIOXIDANTES. **Os antioxidantes**, São Paulo, n. 6, p. 16-30, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.
- GIADA, Maria Lourdes Reis. **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada**. Tese – Doutorado, São Paulo, 2006. Disponível em:

<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9132/tde-22082017-093259/publico/MARIA_LOURDES_REIS_GIADA_DOUTORADO.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2019.

GUIMARÃES, Ana Clara Garcia. **Potencial antioxidante de treze frutos de espécies de ocorrência no cerrado por diferentes metodologias**. Tese – Doutorado, Lavras, 2016. Disponível em:

<http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/12565/3/TESE_Potencial%20antioxidante%20de%20treze%20frutos%20de%20esp%20c3%a9cies%20de%20ocorr%20c3%aancia%20no%20cerado%20por%20diferentes%20metodologias.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2019.

LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v. 7, n. 1, p.83-84, 1972.

LOPES-LUTZ, D. *et al.* Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 08, p. 1732-8, 2008.

LOPES, T. J et al. **Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade**, Florianópolis, v. 13, n. 3, p. 291-297, jul/set 2005. Disponível em:

<<https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=A+estrutura+qu%C3%ADmica+b%C3%A1sica+das+antocianinas+%C3%A9+baseada+em+uma+estrutura+polic%C3%ADlica+de+15+carbonos+%28LOPES+et+al.%2C+2000%29>>. Acesso em: 04 nov. 2019.

MACEDO, F. M et al. **Determinação de compostos fenólicos totais em Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville)**, Porto Alegre, v. 5, p. 1164-1165, jul 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1027/764>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

NETO, L. G; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2006. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/244749688_Plantas_medicinais_Fatores_de_influencia_no_conteudo_de_metabolitos_secundarios>. Acesso em: 04 nov. 2019.

NUNES, M. S; TRALDI, A. B. **Impacto da degradação do cerrado brasileiro sobre fauna e flora**. Disponível em:

<http://www.unicerp.edu.br/images/fotos_noticias/2015/07/saudeemeioambiente/ARTIGO%2005.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2019.

OLIVEIRA, A. C; VALENTIM, I. B; GOULART, M. O. F. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes**, Maceió, v. 32, n. 3, p. 689-702, abr 2009. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a13v32n3.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

OLIVEIRA, V. P; ESPESCHIT, A. C. R; PELUZIO, M. C. G. **Flavonoides e doenças cardiovasculares: Ação antioxidante**, Viçosa, 2019. Disponível em:

<<http://rmmg.org/artigo/detalhes/580>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

PASSOS, S. X et al. **Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans***, Goiânia, p. 623-627, nov/dez 2002. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v35n6/a13.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

PEREIRA, Mariana de Sousa Pereira. **Estudo comparativo de métodos de avaliação da capacidade antioxidante de compostos bioactivos**. Dissertação-Mestrado, Lisboa, 2010.

Disponível em:

<<https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/3146/3/TESEMESTRADO3x.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2019.

PIRES, J et al. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas**, São Paulo, set 2017. Disponível em:

<https://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=72&tmpl=component&format=raw&Itemid=98>. Acesso em: 03 nov. 2019.

PORTO, Cristian da Silva. **Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de frutos e folhas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)**. Dissertação-Mestrado, Montes Claros, 2008. Disponível em:

<http://www.ppgcb.unimontes.br/images/bibtex/SilvaPorto_2008_Potencialantioxidantede.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2019.

PRAIA, A. S et al. **Artigo-Compostos fenólicos (*En Porgués*)**, Tefé, mai 2014. Disponível em: <<https://procitropicos.org.br/articulo/artigo-compostos-fenolicos-en-portugues/>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

REGINATO, F. Z; SILVA, A. R. H; BAUERMANN, L. F. **Avaliação do uso de flavonoides no tratamento da inflamação**, Santa Maria, p. 569-582, 2015. Disponível em:

<<http://scielo.sld.cu/pdf/far/v49n3/far16315.pdf>>. Acesso em 05 nov. 2019.

ROESLER, R et al. **Atividade antioxidante de frutas do Cerrado**, Campinas, pág 53-60, jan/mar, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n1/09.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

RUFINO, M. S et al. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**, Fortaleza, jul 2007. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2019.

SARKER, S.D; LATIF, Z; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**, New Jersey, 2006.

Disponível em:

<https://books.google.com.br/books?id=NIvvGGyeL3oC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 28 nov. 2019.

SAVI, P. R. S et al. **Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região Sul do Brasil**, v. 12, n 1, p. 275-

287, 2017. Disponível em: <<https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=avalia%C3%A7%C3%A3o+do+teor+de+flavon%C3%B3ides>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

SILVA, L. A et al. **Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β - caroteno/ácido linoleico)**, Manaus, jul 2018. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/598/html>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. AmJ Enol Vitic 1965; 16 (3): 144-6.

SONAL, A., PATIL, S. Evaluation of antioxidant potential of a functional food formulation comprising Psidium guajava fruit, Juglans regia L. Fruit and whey. Advances in Research in Pharmaceutical Biology, New Delhi, v. 2, n. 1, 2012.

SOUSA, C. M et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**, Teresina, v. 30, n. 2, p. 351-355, jan 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/20.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.