



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) E TARUMÃ (*Vitex megapotamica*).**

Sabrina Mores

Florianópolis

2018

Sabrina Mores

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE ALECRIM
(*Rosmarinus officinalis*) E TARUMÃ (*Vitex megapotamica*).**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Salvador Ferreira.

Coorientadora: Dr^a. Kátia Suzana Andrade.

Florianópolis

2018

Sabrina Mores

Avaliação da atividade antioxidante de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e tarumã (*Vitex megapotamica*).

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia de Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 03 de julho de 2018.

Prof. Marcelo Lanza, Dr. Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Sandra Regina Ferreira, Dr.^a

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Manuela Balen, Dr.^a.

Universidade Federal de Santa Catarina

Simone Mazzutti, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de desenvolvimento espiritual e pela inspiração e conforto nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Sidnei e Tânia por todo o carinho, amor, confiança e apoio incondicional. Por todo o suporte financeiro e emocional ao longo desses anos, o qual foi fundamental para minha chegada até aqui.

Ao meu irmão, Vini pelo carinho, confiança e incentivo para que eu pudesse dar início e seguimento a essa caminhada.

Aos meus avós paternos, Américo e Nair; e maternos, Barcelides e Idilie. por todo amor, carinho e presença na minha vida.

A minha madrinha Neuza e meu padrinho Leucir, pelo carinho, preocupação, disposição e companhia, principalmente nos finais de semana.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sandra por toda a orientação necessária para a conclusão desse trabalho.

A minha coorientadora, Kátia, por ter aceitado me coorientar. Por compartilhar seus conhecimentos e tempo, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos colegas do LATESC pela acolhida, por dividirem seus espaços e conhecimentos, pela gentileza e solicitude ao responderem às minhas dúvidas.

As minhas amigas, Anelise e Barbara pela amizade, por todo o apoio durante a graduação e, principalmente, durante a realização desse trabalho. Obrigada pelos momentos de descontração. Serei eternamente grata pela oportunidade de conhecer vocês.

Ao Daniel pela amizade e ajuda na obtenção de matérias-primas.

A minha amiga Taina pelas longas conversas, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

À banca que se fez presente para contribuir com a avaliação e aperfeiçoamento deste trabalho.

E a todos que contribuíram de forma direta e indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma planta nativa da região do Mediterrâneo Ocidental, pertencente à família Lamiaceae e muito utilizada como condimento devido ao seu aroma forte e agradável. Há muito tempo essa planta é empregada na medicina popular para tratar diversas enfermidades, sendo sua composição rica em compostos bioativos associada a diversas propriedades biológicas. Tarumã (*Vitex megapotamica*) é uma planta nativa não endêmica do Brasil. Na medicina popular a infusão das folhas do tarumã é utilizada para tratar várias enfermidades e alguns estudos relatam efeitos terapêuticos dessa planta devido a presença de compostos bioativos. Os objetivos deste trabalho foi obter extratos bioativos de *R. officinalis* e *V. megapotamica* com utilização do método Soxhlet e avaliar o teor de fenólicos e a atividade antioxidante desses extratos. Os maiores rendimentos foram obtidos com solvente etanol 70 % de polaridade inferior (6,1) para *R. officinalis* ($21,8 \pm 0,3$ %) e *V. megapotamica* ($19,6 \pm 0,7$ %), indicando a presença de grande quantidade de compostos de polaridade intermediária. Todos os extratos de *R. officinalis* e *V. megapotamica* apresentaram elevado teor de compostos fenólicos. Os resultados mostraram maior teor de fenólicos extraídos de *R. officinalis* ($175,5 \pm 4,3$ mg GAE/g extrato) quando empregado o solvente de menor polaridade (etanol 70 %), enquanto *V. megapotamica* (170 ± 7 mg GAE/g extrato) apresentou melhor resultado quando empregado solvente de maior polaridade (etanol 50 %). A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelos métodos do radical DPPH e ABTS. Verificou-se uma relação positiva entre os resultados obtidos pelos métodos DPPH e ABTS. O emprego de *R. officinalis* e *V. megapotamica* como matéria-prima para obtenção de compostos antioxidantes é promissor, devendo ser mais explorada visando sua utilização na indústria farmacêutica e de alimentos.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. *Vitex megapotamica*. Soxhlet. Compostos fenólicos. DPPH. ABTS.

ABSTRACT

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) is a native plant of the Western Mediterranean region, belonging to the Lamiaceae family and widely used as a condiment due to its strong and pleasant aroma. It has long been used in folk medicine to treat several diseases and its composition, which is rich in bioactive compounds, is associated with a variety of biological characteristics. Tarumã (*Vitex megapotamica*) is a native but not endemic plant of Brazil. In traditional medicine, the infusion of tarumã leaves is used to treat a number of diseases and some studies have reported that the therapeutic effects of this plant are due to the presence of bioactive compounds. The aims of this project were to obtain bioactive extracts from *R. officinalis* and *V. megapotamica* through the Soxhlet method, and to evaluate the phenolic content and the antioxidant activity of these extracts. The highest yields were obtained using solvent of lower polarity (ethanol 70 %) for *R. officinalis* (21.8 ± 0.3 %) and *V. megapotamica* (19.6 ± 0.7 %), indicating the presence of large amount of compounds of intermediate polarity. All of *R. officinalis* and *V. megapotamica* extracts revealed high contents of phenolic compounds. The results indicated that a higher level of phenolic content was obtained from *R. officinalis* (170 ± 7 mg GAE / g extract) when using the solvent of lower polarity (ethanol 70 %), while *V. megapotamica* (170 ± 7 mg GAE / g extract) showed better results when a solvent of greater polarity was used (ethanol 50 %). The antioxidant capacity of the extracts was evaluated by the radical DPPH and ABTS methods and there was a positive relation between the results obtained by the DPPH and ABTS methods. The usage of *R. officinalis* and *V. megapotamica* as raw material to obtain antioxidant compounds is a promising strategy and should be further explored aiming its application in the pharmaceutical and food industries.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. *Vitex megapotamica*. Soxhlet. Phenolic compounds. DPPH. ABTS.

*“Listen to the MUSTN'TS, child,
Listen to the DON'TS
Listen to the SHOULDN'TS
The IMPOSSIBLES, the WONT'S
Listen to the NEVER HAVES
Then listen close to me —
Anything can happen, child,
ANYTHING can be”
(Shel Silverstein)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alecrim durante o período de floração.....	16
Figura 2 – Árvore de Tarumã	17
Figura 3 – Folhas de Tarumã.....	17
Figura 4 – Reações envolvidas na autoxidação (Iniciação e Propagação)	20
Figura 5 – Extrator Soxhlet convencional	26
Figura 6 – Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	28
Figura 7 – Formas (a) radicalar e (b) não radicalar do DPPH.....	30
Figura 8 – Redução do ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	31
Figura 9 – Fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho	33
Figura 10 – Equipamento para extração em Soxhlet.....	35
Figura 11 – Curva padrão de ácido gálico utilizada no cálculo de TFT os extratos de <i>R. officinalis</i> e <i>V. megapotamica</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de umidade das amostras de <i>R. officinalis</i> e <i>V. megapotamica</i> após secagem.	40
Tabela 2 – Rendimentos globais de extração (X_0) obtidos para as extrações em Soxhlet de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Vitex megapotamica</i> com solventes orgânicos.	40
Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expresso em equivalentes de ácido gálico, para extração em Soxhlet de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Vitex megapotamica</i>	42
Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Vitex megapotamica</i> e BHT através dos métodos DPPH e ABTS.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS^{•+} – 2, 2 – azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico

BHA – Hidroxianisol

BHT – Butil hidróxitolueno

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EAG – Equivalente de ácido gálico

F-C – Folin-Ciocalteu

O/W – Emulsão óleo em água

PG – Galato de propila

TBHQ – Terc butil hidroquinona

TEAC – Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

TFT – Teor de compostos fenólicos totais

Trolox – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

h–Hora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVOS.....	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivos Específicos.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	ALECRIM	15
2.2	TARUMÃ.....	16
2.3	OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ALIMENTOS	18
2.3.1	Autoxidação	18
2.3.1.1	<i>Iniciação</i>	19
2.3.1.2	<i>Propagação</i>	19
2.3.1.3	<i>Terminação</i>	20
2.4	ANTIOXIDANTES.....	21
2.4.1	Antioxidantes sintéticos	21
2.4.2	Antioxidantes Naturais	22
2.4.2.1	Compostos Fenólicos	23
2.5	EXTRAÇÃO SOXHLET	25
2.5.1	Solvente.....	26
2.6	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS VEGETAIS.....	27
2.7	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
2.7.1	Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	29
2.7.2	Método do radical 2, 2 – azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS)31	
3	MATERIAS E MÉTODOS	33
3.1	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS	34
3.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS ...	34

3.3	EXTRAÇÃO SOXHLET	35
3.4	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO (X_0).....	36
3.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	36
3.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	37
3.6.1	Método DPPH.....	37
3.6.2	Método ABTS	38
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS	40
4.2	RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_0)	40
4.3	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFT)	42
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	43
5	CONCLUSÃO	47
6	Sugestões para trabalhos futuros.....	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE	57

1 INTRODUÇÃO

O aumento do poder aquisitivo da população impulsiona o consumo de produtos industrializados que geralmente estão sujeitos à oxidação. Tal fenômeno destaca-se como uma das principais causas de deterioração e perda de qualidade dos alimentos por propiciar a formação de aromas indesejáveis e de compostos nocivos à saúde (DECKER; ELIAS; MCCLEMENTS, 2010). Para evitar a oxidação e aumentar a vida de prateleira dos alimentos processados utilizam-se antioxidantes, que são substâncias que diminuem ou impedem a oxidação de substratos oxidáveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

Dessa forma, a demanda por antioxidantes tem crescido juntamente com o aumento do consumo de produtos industrializados. A tendência é que países emergentes dirijam seu mercado para antioxidantes sintéticos, principalmente BHA, BHQ e BHT, enquanto que os países mais desenvolvidos tendam a dar preferência para os substitutos naturais, como os extratos de plantas, tais como alecrim e orégano. Esse aumento por uso de antioxidantes naturais está atrelado ao crescimento da demanda por produtos naturais, visto que os consumidores estão procurando cada vez mais estilos de vida saudáveis, estando mais conscientes ao escolher os alimentos que consomem. Assim, produtos com ingredientes como antioxidantes naturais são mais visados, uma vez que o termo “natural” é equiparado a “saudável” e “bom para sua saúde” (SHAHIDI, 2015; WISE GUY REPORTS, 2017).

Apesar disso, por apresentarem custos mais elevados, os antioxidantes naturais têm substituído os sintéticos de maneira mais expressiva nos países desenvolvidos, cuja população tem maior poder aquisitivo e está disposta a pagar por produtos com alternativas naturais.

As ervas e especiarias estão dentre as melhores fontes de antioxidantes naturais (SHAHIDI, 2015). Extratos de plantas como alecrim, sálvia e orégano, já estão disponíveis comercialmente e são amplamente utilizados em produtos à base de carne. Estas substâncias contêm compostos antioxidantes variados, incluindo carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, rosmanol e rosmariquinol (HAWORTH, 2003).

Dentre os extratos vegetais, algumas plantas da família Lamiaceae tem se destacado por apresentar elevado potencial antioxidante. Diante do exposto, essa pesquisa tem como objetivo avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de alecrim e tarumã, plantas que pertencem à família Lamiaceae e que podem ter potencial para aplicação em alimentos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de alecrim e tarumã obtidos por métodos a baixa pressão utilizando solventes verdes.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Obter extratos das plantas selecionadas utilizando mistura de etanol e água como solvente;
- b) Avaliar o teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu;
- c) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos através dos métodos: DPPH e ABTS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALECRIM

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma planta nativa da região do Mediterrâneo Ocidental e pertencente à família *Lamiaceae*. Por apresentar diversas aplicações, o *R. officinalis* tem sido cultivado ao redor de todo o mundo, inclusive no Brasil (FONT QUER, 1999; SHAHIDI, 2015).

Na culinária o alecrim é muito utilizado como condimento devido ao seu aroma forte e agradável, contribuindo para o *flavor* dos alimentos. Além disso, há muito tempo essa planta ilustrada na Figura 1 vem sendo empregada também na medicina popular para tratar diversas enfermidades tais como: dores de cabeça, inflamações e problemas do sistema digestivo e circulatório (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999).

Ao alecrim já foram atribuídas propriedades biológicas que estão diretamente relacionadas com a sua composição rica em compostos bioativos (BORRÁS-LINARES et al., 2014). Dentre os compostos destacam-se: ácido rosmarínico, carnósico e carnosol, além de flavonoides, diterpenos e triterpenos (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; ARGUETA; CANO; RODARTE, 1994; NGO; BRAND-WILLIAMS; HEAD, 2011).

Diversos estudos verificaram que os diterpenos fenólicos presentes no alecrim apresentam propriedades promotoras da saúde, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, neuroprotetora, além de propriedades anticancerígenas (KIM et al., 2006; POECKEL et al., 2008; WECKESSER et al., 2007).

Chun et al. (2014) avaliaram a capacidade quimiopreventiva de carnosol presente no alecrim e observaram a eficiência na prevenção de câncer de pulmão e de mama, bem como no papiloma cutâneo.

Outro grupo de metabólitos vegetais secundários promissores encontrados no alecrim são os triterpenos (BORRÁS-LINARES et al., 2014). O ácido ursólico, por exemplo, é um triterpeno pentacíclico que apresenta propriedade anti-carcinogênica e anti-inflamatória (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999).

Figura 1 – Alecrim durante o período de floração



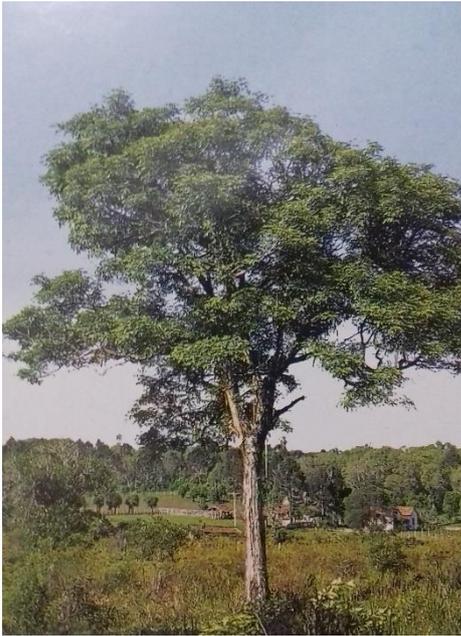
Fonte: Preedy (2016)

2.2 TARUMÃ

A espécie *Vitex megapotamica* pertence à família Lamiaceae e é nativa não endêmica do Brasil, tendo ocorrência nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e principalmente em Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Essa espécie também pode ser encontrada no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e no Uruguai. Tarumã, azeitonado-mato, tapinhoan, tarumã-preta e tarumã-do-mato são alguns dos nomes populares da espécie *V. megapotamica* (CARVALHO, 2006; LORENZI, 2008).

A árvore de tarumã ilustrada na Figura 2 tem altura entre cinco e vinte metros e tronco de 40 a 60 cm, florescendo de outubro a dezembro junto com o aparecimento das novas folhas. Já os frutos de pericarpo roxo-escuro quase preto são comestíveis, apresentam sabor adocicado e amadurecem de janeiro a março. As folhas contêm sete folíolos desiguais e opostos-cruzados, suas nervuras são imersas na face superior e salientes embaixo com coloração verde não muito intensa na parte dorsal e mais clara na parte ventral, conforme pode ser visualizado na Figura 3 (CARVALHO, 2006; LORENZI, 2008).

Figura 2 – Árvore de Tarumã



Fonte: Lorenzi (2008)

Figura 3 – Folhas de Tarumã



Fonte: Lorenzi (2008)

Na medicina popular a infusão das folhas do tarumã é utilizada como depurativo do sangue, no tratamento de hipertensão arterial, ácido úrico colesterol elevado, inflamações da bexiga, do útero e da próstata (CARVALHO, 2006).

Zanatta et al. (2007) verificaram ação anti-hiperglicêmica capaz de melhorar o estado diabético dos extratos das folhas de *V. megapotamica*. Estudos também atribuíram efeito

hipolipidêmico e redução dos níveis séricos de colesterol e triacilglicerol a folhas e cascas de *V. megapotamica* (BRANDT et al., 2009).

Brum et al. (2011) obtiveram extratos alcoólicos e aquosos de folhas de *V. megapotamica* e detectaram a presença de heterosídeos antociânicos, fenóis, taninos, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, esteroides, triterpenoides (esteróides livres) e ácidos orgânicos. Segundo os autores, as propriedades medicinais observadas no uso de tarumã estão relacionadas com a presença desses compostos.

2.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ALIMENTOS

As reações de oxidação são responsáveis pela degradação de vários alimentos, sendo a principal causa da perda de qualidade dos alimentos lipídicos, uma vez que são mais susceptíveis a esse tipo de reação.

A oxidação lipídica é responsável por alterações que envolvem perda de *flavor*, formação de *off-flavors*, modificações da cor, aroma, textura e diminuição da qualidade nutricional. Tais fatores geralmente são responsáveis pela limitação da vida útil (*shelf-life*) do produto. Além disso, as reações de oxidação podem gerar compostos nocivos à saúde do consumidor (WASOWICZ et al., 2004).

Apesar disso, em alguns alimentos as alterações provocadas pelas reações oxidativas são desejáveis. Durante o cozimento da carne, por exemplo, a combinação entre oxidação lipídica e reação de Maillard é responsável pelo desenvolvimento de sabor, odor e coloração característica, porém essa reação deve ocorrer de forma moderada (CHIAVARO et al., 2009). A formação de voláteis através das reações oxidativas também é desejável em alimentos fritos, queijos e cereais secos, uma vez que quantidades pequenas desses compostos são importantes para o *flavor* (CHAIYASIT et al., 2007).

Tendo em vista que os lipídios estão presentes na maioria dos sistemas alimentícios, ainda que em baixa quantidade, é importante buscar alternativas que retardem as reações oxidativas visando à manutenção da qualidade do produto.

2.3.1 Autooxidação

A oxidação dos lipídios pode ocorrer através de três diferentes formas: por autooxidação, pela fotoxidação e/ou pela rota da lipoxigenase. O mecanismo de autooxidação

envolve reações de radicais livres, diferenciando-se apenas no estágio de iniciação da fotoxidação e da lipoxigenase (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

A autoxidação, principal causa da oxidação lipídica, consiste num conjunto complexo de reações em cadeia envolvendo radicais livres sendo descritas basicamente por três etapas: iniciação, propagação e terminação.

2.3.1.1 Iniciação

Apesar de ocorrer facilmente, a reação de oxidação não ocorre por si só, ou seja, não é uma reação espontânea. Dessa forma, para que ela aconteça é necessário um iniciador ou catalisador responsável por remover um elétron do lipídio ou do oxigênio, permitindo a formação de radicais. Além disso, por fotossensibilização o oxigênio pode ser transformado da forma triplete para singlete. O oxigênio singlete é mais eletrofílico, podendo assim reagir diretamente com a ligação dupla produzindo hidroperóxidos (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010; ESKIN; SHAHIDI, 2013).

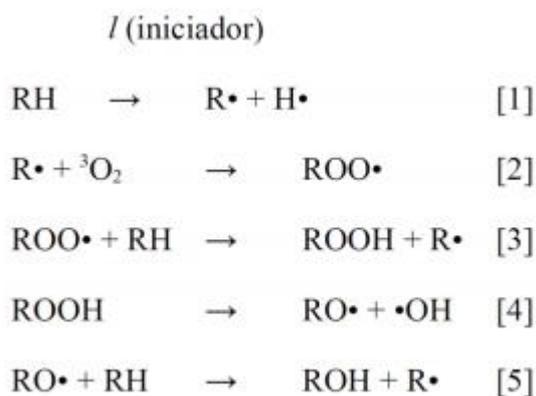
Segundo Araujo (2008) alguns fatores podem desencadear a etapa de iniciação: altas concentrações de oxigênio; elevada temperatura; teor de umidade muito baixo ou muito elevado; presença de íons metálicos; metaloproteínas e luz. Independente de qual for o desencadeador da reação, nesta etapa de iniciação tem-se como resultado final a formação de um radical alquil ($R\bullet$)[1]. A facilidade de formação de radicais de ácidos graxos aumenta com o crescimento da insaturação, sendo assim ácidos graxos poliinsaturados são mais suscetíveis a sofrerem oxidação (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

2.3.1.2 Propagação

Segundo Kochi (1973) a propagação (Figura 4) é o coração do processo de oxidação. Nesta etapa, o oxigênio adiciona-se ao radical alquil ($R\bullet$) formado na etapa anterior a taxas controladas pela difusão. A combinação dos radicais alquil não reativos ($R\bullet$) com um dos radicais do oxigênio triplete resulta nos radicais peroxil ($ROO\bullet$)[2] que são espécies reativas. Estes radicais apresentam elevada energia, dessa forma promovem a abstração de hidrogênio de moléculas lipídicas adjacentes para formar hidroperóxidos de ácidos graxos ($ROOH$) [3] e geram novos radicais alquil ($R\bullet$) no processo. Cada novo radical alquil, por sua vez adiciona oxigênio formando radicais peroxil que abstrai hidrogênio de outro lipídio, formando outro hidroperóxido [4] que gera novamente um novo radical alquil [5], dessa forma tem-se a

propagação da reação em cadeia (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010; ESKIN; SHAHIDI, 2013).

Figura 4 – Reações envolvidas na autoxidação (iniciação e propagação)



Fonte: Fuentes (2011)

2.3.1.3 Terminação

Nesta etapa tem-se a combinação de dois radicais para a formação de espécies não radicais. A temperatura e a pressão de oxigênio determinam as vias de recombinação dos radicais. Na presença de oxigênio, predomina o peroxil como radical livre, visto que o oxigênio será adicionado aos radicais alquil a taxas de difusão limitadas. Sendo assim, em condições atmosféricas, as reações de terminação podem ocorrer entre radicais peroxil e alcoxil (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Em ambientes de baixa pressão de oxigênio e altas temperaturas como encontrado nos óleos de fritura predomina a combinação entre os radicais alquil, formando-se dímeros de ácidos graxos. Devido a isso, os polímeros de ácidos graxos são utilizados como indiciadores da qualidade de óleos de fritura (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A autoxidação, além de promover a quebra de compostos, também permite a formação de novos compostos responsáveis por mudanças nas características físicas e sensoriais dos alimentos. A degradação de hidroperóxidos pode formar compostos de baixo peso molecular e voláteis tais como aldeídos, alcoóis, cetonas, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Essas substâncias são responsáveis por desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, além disso, algumas delas possuem potencial tóxico e seu consumo pode acarretar riscos para a saúde (FUENTES, 2011).

2.4 ANTIOXIDANTES

Uma vez que a oxidação lipídica causa muitos problemas para a indústria de alimentos, há um grande interesse em preveni-la. Uma maneira de retardar ou mesmo inibir o processo oxidativo é por meio da adição de antioxidantes aos alimentos.

O uso de antioxidantes em alimentos foi praticado de forma não intencional desde a antiguidade, quando povos que viviam em países de clima quente como Índia, Tailândia e China adicionavam especiarias aos alimentos e percebiam aumento da vida útil e diminuição na ocorrência de deterioração. Com o passar do tempo, o uso intencional de especiarias com propriedades antioxidantes tornou-se comum na indústria alimentícia, bem como o desenvolvimento e uso de antioxidantes sintéticos (SHAHIDI, 2015).

Os antioxidantes consistem em compostos não nutritivos presentes nos alimentos em baixas concentrações e possuem a capacidade de retardar ou inibir significativamente a oxidação de substratos oxidáveis. Esses estão naturalmente presentes nos alimentos, mas também podem ser adicionados ou formados durante o processamento, sendo que quando utilizados em produtos alimentícios devem apresentar algumas características como: não apresentar toxicidade, custo razoável, eficácia em baixas concentrações e não devem alterar o *flavor*, a cor e a textura da matriz do alimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; SCHULER, 1990).

2.4.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são largamente utilizados pela indústria de alimentos com o objetivo de inibir a oxidação, dentre eles destacam-se quatro por serem mais utilizados: butil hidroxianisol (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propila (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (SHAHIDI, 2015).

Entretanto, o uso desses compostos é controverso e sua segurança tem sido questionada. Uma vez que a toxicidade de alguns antioxidantes sintéticos não é facilmente avaliada, muitos países têm imposto restrições ao uso deles. A carcinogenicidade de BHA e BHT em animais submetidos a experimentos foi relatada por Hocman (1981). Outros estudos demonstraram que BHA tem efeitos cancerígenos em não-roedores (porcos e macacos) e relataram a formação de lesões no estômago de ratos, enquanto BHT foi relacionado a efeitos cancerígenos no fígado de ratos e camundongos (BOTTERWECK et al., 2000).

Dessa forma, estudos toxicológicos aprofundados são muito importantes na avaliação dos riscos associados ao consumo de antioxidantes e determinação do seu índice de ingestão diária (IDA). O elevado custo relacionado a esses estudos de toxicidade, o tempo necessário para obter a aprovação pelos órgãos reguladores de aditivos alimentares, bem como a crescente preferência do consumidor por ingredientes naturais, tem limitado o uso de antioxidantes sintéticos e tem-se buscado substituí-lo por naturais (HAUMANN, 1990).

De 2000 até 2010 o volume global de antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos diminuiu 0,5 %. Essa redução pouco significativa ocorreu principalmente por causa de países populosos em desenvolvimento, onde os consumidores relutam ou são incapazes de pagar mais por produtos que utilizam alternativas naturais (LOGAN; NIENABER; PAN, 2013). A União Europeia foi líder mundial na mudança para antioxidantes naturais, diminuindo o uso de antioxidantes sintéticos em mais de 3 % (EUROMONITOR, 2017; LOGAN; NIENABER; PAN, 2013).

Cada antioxidante fenólico sintético possui características próprias que dependem da sua estrutura química e da natureza do alimento no qual é utilizado. Os fenóis nos quais o anel aromático possui grupos alquil são antioxidantes extremamente eficientes, além de possuírem propriedades antimicrobianas. A estabilidade térmica também é um fator que varia de composto para composto. Os antioxidantes BHA e BHT são relativamente estáveis ao calor e por isso utilizados em alimentos termicamente processados, já o PG não é indicado para alimentos processados a altas temperaturas, uma vez que decompõe-se em cerca de 148 °C (SHAHIDI; ZHONG, 2005).

O TBHQ é, de maneira geral, mais eficaz em óleos vegetais que BHA ou BHT e em relação à gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT ou o PG. Por ser muito resistente ao calor, o TBHQ é considerado como um dos melhores antioxidantes para se utilizar em óleos de fritura, além de proporcionar estabilidade para os produtos acabados (RAMALHO, 2006).

2.4.2 Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados em quase todas as plantas, microrganismos, fungos e até mesmo em tecidos animais (POKORNY, 1999). De maneira geral, os antioxidantes naturais são: compostos fenólicos (carnosol, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, ácido carnósico, ácido ferúlico, eugenol, flavonóides, entre

outros), aminoácidos, ácidos orgânicos (cítrico, tartárico e ascórbico), lecitina, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), ácidos fítics, proteínas, saponinas, vitamina E, β -caroteno, curcumina, ligninas, hidrolisados proteicos, esteróis e ácido úrico (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996). Ácido ascórbico e tocoferóis são os antioxidantes naturais de maior importância comercial e têm sido bastante explorados os extratos de plantas com potencial antioxidante, tais como alecrim e sálvia (AKOH; MIN, 2008).

Os antioxidantes naturais permitem que a indústria de alimentos coloque a disposição dos consumidores produtos com ingredientes totalmente naturais. Apesar disso, esses compostos apresentam algumas desvantagens, tais como: necessidade de altas concentrações; *flavor* indesejável; alterações de cor e falta de estabilidade devido à baixa eficiência antioxidante. A segurança dos antioxidantes naturais tende a ser maior do que dos sintéticos, entretanto, deve-se tomar algumas precauções, tendo em vista algumas substâncias naturais são potenciais agentes cancerígenos, mutagênicos e tóxicos. A principal vantagem das substâncias naturalmente presentes nos alimentos é que sua segurança pode ser garantida de maneira menos onerosa do que as substâncias sintéticas (AKOH; MIN, 2008).

2.4.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem substâncias com anel aromático, o qual apresenta pelo menos um substituinte hidroxílico, variando de compostos fenólicos simples até moléculas altamente polimerizadas (BRAVO, 1998).

Uma grande variedade de compostos fenólicos biologicamente ativos contendo um ou mais anéis aromáticos são encontrados naturalmente em frutas e vegetais, onde são responsáveis por grande parte do sabor, cor e textura. Dessa forma, extrato de frutas, ervas e vegetais tem gerado cada vez mais interesse para a indústria de alimentos por retardarem oxidação lipídica. Há uma relação entre a concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante total (HU; SKIBSTED, 2002; KAHKONEN et al., 1999).

Os extratos de alecrim (*Rosmarinus Officinalis*) caracterizam-se por serem ricos em compostos fenólicos com propriedades químicas únicas, por isso eles apresentam ampla aplicabilidade em alimentos e bebidas (SHAHIDI, 2015).

A literatura está repleta de estudos que relatam o isolamento e identificação de antioxidantes presentes em plantas da família Lamiaceae. Algumas espécies dessa família apresentam compostos fenólicos comuns, como é o caso do alecrim e sálvia. Para ambas as plantas foram isolados compostos fenólicos, tais como: ácido carnósico; ácido rosmarínico;

ácido 12-metilcarnósoico; ácido cafeico; ácido vanílico; apigenina; carnosol; rosmadial; metilcarnosato; rosmanol; luteolina; isorosmanol e epirosmanol (SHIMANO, 2012). Tais compostos apresentam solubilidade e polaridade variáveis, sendo o ácido carnósico bastante lipofílico e o ácido rosmarínico mais hidrofílico. Dessa forma, os extratos de alecrim têm a capacidade de fornecer espécies antioxidantes poderosas tanto para as fases polares como para apolares que compõem o alimento (SHAHIDI, 2015).

Diversos pesquisadores apontam o ácido carnósico como o mais potente antioxidante presente no alecrim, sendo essa uma das razões para o alecrim ser amplamente empregado na indústria de alimentos (SHAHIDI, 2015).

Diferentemente do alecrim, os estudos disponíveis na literatura que avaliam extratos de tarumã são reduzidos e têm se intensificado nos últimos anos. No entanto, a maioria dos estudos focam na ação farmacológica dos extratos em detrimento da aplicabilidade desses na indústria de alimentos.

Onofre et al. (2016) observaram presença de flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, esteroides, alcaloides e antraquinonas em amostras de extrato de *Vitex megapotamica*.

Hamann et al. (2016) obtiveram extratos de *V. megapotamica* por maceração utilizando etanol 70 % como solvente. Os autores avaliaram os extratos e identificaram os seguintes compostos como majoritários: ácidos vanílico, cafeico, ρ -cumárico, ferúlico, trans-cinâmico e clorogênico, além das flavonas luteolina, apigenina, quercetina e rutina. O ácido clorogênico ($1279,2 \pm 34,0 \mu\text{g/g}$) e a luteolina ($1325,8 \pm 15,6 \mu\text{g/g}$) foram os compostos fenólicos mais abundantes encontrados no extrato bruto. Os mesmos autores demonstraram ação antidepressiva e antinociceptiva (redução na capacidade de sentir dor) do extrato bruto de *V. megapotamica*.

As frações e extrato bruto de *V. megapotamica* testados por Brum et al. (2013) apresentaram capacidade antioxidante efetiva, destacando-se a fração de acetato de etila como a de maior atividade inibitória lipídica e de maiores teores de compostos fenólicos, flavonoides e taninos. Além disso, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência realizada pelos autores revelou a presença de ácido clorogênico e rosmarínico no extrato bruto de *V. megapotamica*.

2.5 EXTRAÇÃO SOXHLET

A extração é a etapa inicial e de extrema importância para o estudo de antioxidantes naturais presentes em plantas. Muitos são os fatores que interferem na eficiência desse processo, tais como: natureza e concentração do solvente, temperatura, tempo e pH da extração. Dentre eles um dos fatores que exerce maior influência é o solvente, sendo que uma grande gama de solventes pode ser utilizada para obtenção de antioxidantes de plantas e alimentos. A seleção do solvente a ser utilizado depende das características do antioxidante que se deseja extrair, tais como natureza química e polaridade do composto (WASOWICZ et al., 2004).

Como a maioria dos fenóis, flavonoides e antocianinas são hidrossolúveis, para extraí-los utilizam-se solventes polares e de média polaridade tais como água, metanol, etanol, propanol, acetona e suas misturas aquosas. Já os compostos lipossolúveis como os carotenoides devem ser extraídos através da mistura de solventes contendo hexano com acetona, metanol, etanol ou misturas de etil acetato com acetona, etanol ou metanol (XU et al., 2017).

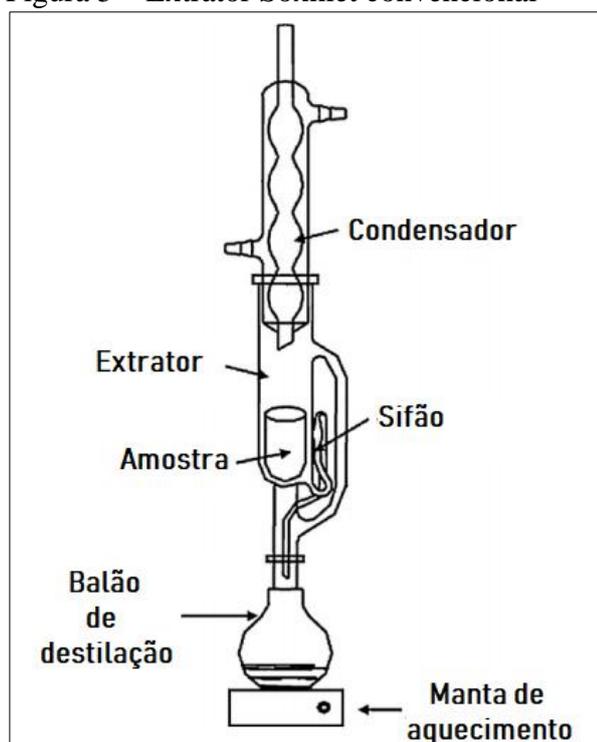
A extração em Soxhlet é uma técnica de extração sólido-líquido exaustiva cujo princípio de operação é baseado na transferência do analito alvo presente na matriz da amostra para o solvente orgânico apropriado, garantindo que o solvente de extração esteja continuamente em contato com o sólido (amostra) durante o processo com aquecimento (DASO; OKONKWO, 2015).

Sendo assim, a amostra entra em contato com o solvente repetidas vezes, permitindo uma renovação constante, o que facilita o equilíbrio da transferência. Além disso, o sistema de extração é mantido em temperaturas relativamente altas, contribuindo assim para a extração de compostos que estão nos poros da matriz sólida. Outra vantagem é que o método não exige filtração para separação da matéria-prima do solvente ao término do processo de extração (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

O aparelho de extração Soxhlet convencional é composto por balão de destilação, suporte para amostra (dedal), sifão, condensador e uma manta de aquecimento como representado na Figura 5. Na prática, uma amostra sólida suficientemente seca é embalada em papel de filtro e colocada dentro do dedal. Os vapores de solvente gerados a partir do balão aquecido contendo o solvente de extração passam pelo dedal e tornam-se líquidos no condensador. O processo de extração começa no momento em que o solvente liquefeito mantém contato com a amostra no dedal. O nível do solvente condensado, portanto, aumenta

até atingir o nível de transbordamento. Neste ponto, um efeito de sifão instantâneo faz com que o extrato, composto por soluto e solvente, caia novamente no balão de destilação. Dentro do balão, apenas o solvente fresco evapora, resultando em um movimento cíclico contínuo do solvente de extração. Um movimento cíclico completo do solvente fresco do balão de destilação até retornar ao balão como um extrato é chamado de "ciclo". O processo é repetido até a extração completa (DASO; OKONKWO, 2015).

Figura 5 – Extrator Soxhlet convencional



Fonte: Adaptado de Castro e Priego-Capote (2010)

2.5.1 Solvente

A composição do solvente utilizado é uma variável muito importante no processo de extração, sendo importante sua otimização para obtenção de bons rendimentos de extração através de um processo economicamente viável (MEIRELES, 2009).

Os antioxidantes e outras substâncias extraídas das amostras dependem em parte da solubilidade de cada um desses compostos no solvente ou mistura de solventes de extração. Os solventes lipofílicos dão origem a oleorresinas contendo níveis relativamente elevados das espécies antioxidantes menos polares, tais como o ácido carnósico, além de substâncias lipídicas, como triacilgliceróis, fosfolípidios, esteróis, ceras e ácidos triterpenos. Essas

oleoresinas são geralmente fluidas e solúveis em óleo, embora possam também ser pastas bastante viscosas. Mesmo quando a água não é utilizada como um dos solventes de extração, os níveis de umidade nos solventes e nas especiarias desempenham um papel importante na determinação da natureza da oleoresina produzida, em grande parte pela tendência da água em hidratar os fosfolípidios e, assim, alterar sua solubilidade e viscosidade (SHAIDI, 2015).

Por outro lado, os solventes polares tendem a gerar extratos que são sólidos ou pastas muito viscosas. Tais extratos normalmente contêm níveis elevados de antioxidantes mais polares, dentre eles: ácido rosmarínico, ácido cafeico e flavonoides, além dos outros constituintes de característica polar, como carboidratos e proteínas. Os extratos polares são menos solúveis em óleos e, conseqüentemente, mais solúveis em sistemas aquosos. Isto não quer dizer que as misturas de solventes polares excluam todos os componentes lipofílicos ou que os solventes menos polares excluam todos os componentes hidrofílicos (SHAIDI, 2015).

A extração com solventes é uma maneira econômica de separar os compostos antioxidantes de plantas. O alecrim, por exemplo, apresenta espécies antioxidantes tanto polares como apolares, dessa forma trata-se de uma matéria-prima particularmente versátil. Uma vez que é possível alterar a polaridade do solvente utilizado na extração, tem-se mais liberdade para obter extratos diferenciados, os quais podem ser obtidos antevendo sua aplicação. Além disso, a solubilidade e a polaridade dos constituintes antioxidantes são muito importantes na eficácia de uma formulação antioxidante em determinada aplicação alimentar (LOGAN; NIENABER; PAN, 2013; SHAIDI, 2015).

2.6 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS VEGETAIS

A determinação de compostos fenólicos nos extratos de plantas é dificultada pela diversidade e complexidade dos compostos presentes. Apesar disso, vários métodos são utilizados para determinação de compostos fenólicos totais em alimentos e amostras biológicas, sendo geralmente baseados na reação de compostos fenólicos com um reagente colorimétrico. As reações colorimétricas são amplamente utilizadas devido a sua facilidade de aplicação bem como seu baixo custo (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013).

O ensaio Folin-Ciocalteu (F-C) é um dos métodos mais utilizados, sendo proposto como método padrão para controle de qualidade e medida da capacidade antioxidante de alimentos e suplementos dietéticos. Tal método tem como mecanismo básico a reação de oxirredução (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007). Apesar de não caracterizar a atividade

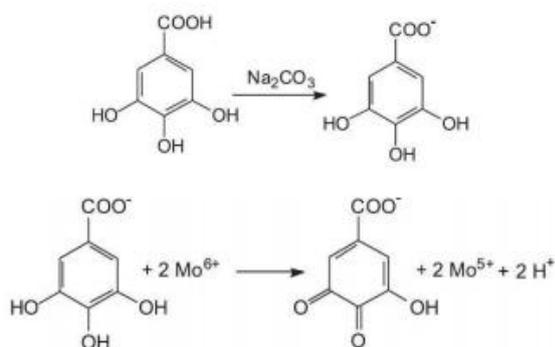
antioxidante, o F-C é um dos melhores métodos para estimar a atividade antioxidante total da amostra (RIBEIRO, 2007; ROGINSK; LISSI, 2005).

O método F-C consiste na redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos em meio básico. O reagente Folin-Ciocalteu possui complexos de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI), apresentando coloração amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Entretanto, esse complexo é reduzido pelas hidroxilas fenólicas presentes no extrato vegetal, produzindo molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e que apresentam absorvância máxima em 765 nm. Dessa forma, o complexo de coloração azul pode ser quantificado por espectrofotometria. (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; REZENDE, 2010).

O ácido gálico geralmente é utilizado como padrão de referência do ensaio e o conteúdo de compostos fenólicos é expresso em equivalente de ácido gálico (EAG), entretanto, outros padrões podem ser utilizados tais como catequina, ácido tânico, ácido clorogênico e ácido cafeico (SHAHIDI, 2015).

Na Figura 6 está ilustrada a desprotonação dos compostos fenólicos, nesse caso o ácido gálico é o padrão em meio básico, gerando os ânions. Em seguida, ocorre a reação de oxi-redução entre o ânion e o reagente de Folin cujo molibdênio sofre redução e o meio reacional muda a coloração de amarela para azul (REZENDE, 2010).

Figura 6 – Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu



Fonte: Rezende (2010)

A simplicidade, robustez e reprodutibilidade destacam-se como vantagens do método F-C, entretanto tal método apresenta algumas desvantagens como: sensibilidade ao pH, temperatura e tempo de reação, além disso pode ocorrer superestimação do conteúdo fenólico

total devido a presença de agentes redutores não fenólicos como açúcares e proteínas (SHAHIDI, 2015).

2.7 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

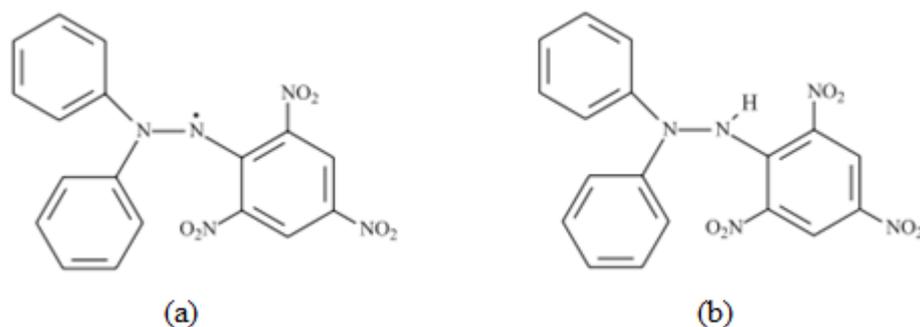
Existem vários métodos que permitem avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias bioativas, os quais envolvem desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando diversas técnicas instrumentais (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). O poder antioxidante de uma amostra não pode ser avaliado baseando-se em apenas um método, sendo na prática utilizados vários métodos *in vitro* para avaliação do potencial antioxidante das amostras de interesse. Os métodos variam em diferentes aspectos, devendo-se escolher aqueles que melhor adequam-se ao objetivo da pesquisa. De maneira geral, os testes *in vitro* que utilizam sequestro de radical livre caracterizam-se por serem de fácil execução. Dentre os métodos de sequestro de radicais livres tem-se o DPPH, que é rápido, barato quando comparado a outros testes e, além disso, é simples por não envolver muitas etapas e reagentes (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Basicamente, os antioxidantes podem ser classificados em “*scavenger*” ou “*quencher*” dependendo de como agem sobre os radicais livres. Os antioxidantes “*scavenger*” são aqueles que agem no radical livre tornando-o menos reativo, enquanto que os “*quencher*” são aqueles que absorvem toda a energia de excitação e como consequência conseguem neutralizar totalmente o radical livre (RIBEIRO, 2007).

2.7.1 Método sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A molécula de DPPH caracteriza-se por ser um radical livre estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, dessa forma a molécula não dimeriza, diferentemente da maioria dos outros radicais. Essa deslocalização faz com que molécula apresente coloração violeta/púrpura, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 517 nm. Quando misturado em solução com um substrato de capacidade antioxidante, o DPPH assume sua forma reduzida, a hidrazina, resultando em mudança da sua coloração violeta para amarelo pálido (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; ALVES et al., 2010). A Figura 7 ilustra a molécula de DPPH na forma radicalar em (a), estrutura de coloração violeta e sua forma reduzida em (b) que assume coloração amarelo pálido.

Figura 7 – Formas (a) radicalar e (b) não radicalar do DPPH



Fonte: Alves et al. (2002)

A descoloração atua como um indicador da capacidade antioxidante e pode ser expressa em termos de concentração efetiva (CE_{50}), o qual indica a concentração de antioxidante necessária para reduzir pela metade a concentração inicial de radicais livres DPPH a partir do momento que se atinge a estabilidade. O tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio com a CE_{50} é definido como $T_{CE_{50}}$ e a relação entre esses parâmetros indica a eficiência antirradical (EA) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SHAHIDI, 2015).

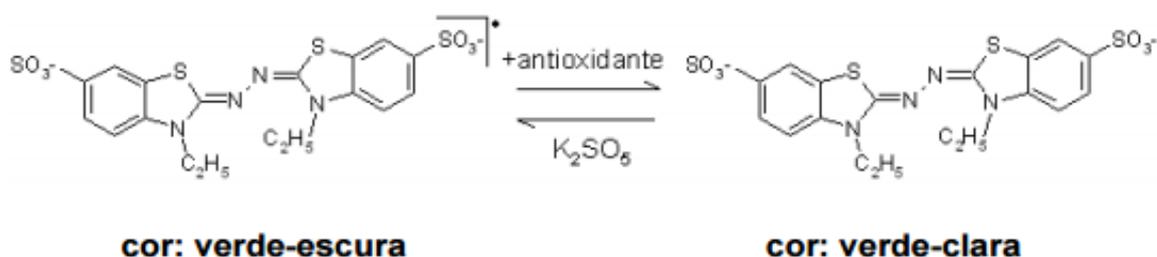
O método do sequestro do radical DPPH é considerado um dos métodos mais fáceis, uma vez que requer apenas um espectrofotômetro UV ou espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica, além de ser preciso e reprodutivo na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides. Esse método é baseado na suposição de que a atividade antioxidante é igual à capacidade de doação de elétrons, ou seja, ao poder de redução (SHAHIDI, 2015).

A principal limitação do ensaio espectrofotométrico de DPPH está relacionada com o fato de que alguns compostos absorvem na mesma faixa de comprimento de onda que o DPPH. Por exemplo, as antocianinas têm uma forte absorção na faixa de comprimento de onda de 500 a 550 nm, bem como os carotenoides, dessa forma, tais compostos podem interferir na interpretação dos resultados (ALVES et al., 2010; SHAHIDI, 2015).

2.7.2 Método do radical 2, 2 – azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS)

O radical $ABTS^{+\bullet}$ necessita ser obtido a partir do ABTS disponível comercialmente através de reações químicas ou enzimáticas. Uma das formas de obtenção do radical consiste em reagir ABTS com o persulfato de potássio, o que gera o radical cátion $ABTS^{+\bullet}$, de coloração esverdeada e bandas de absorção a 645 nm, 734 nm e 815 nm (RE et al., 1999). À medida que antioxidantes são adicionados ao meio reacional, ocorre redução do $ABTS^{+\bullet}$ à ABTS, resultando em decréscimo da coloração do meio reacional, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Redução do $ABTS^{+\bullet}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio



Fonte: Rufino et al. (2007)

A avaliação da capacidade antioxidante é baseada nos resultados obtidos, os quais são expressos em termos da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, uma vez que essa substância foi utilizada como padrão de referência. Tal valor foi denominado TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), sigla em inglês para capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (RE et al., 1999).

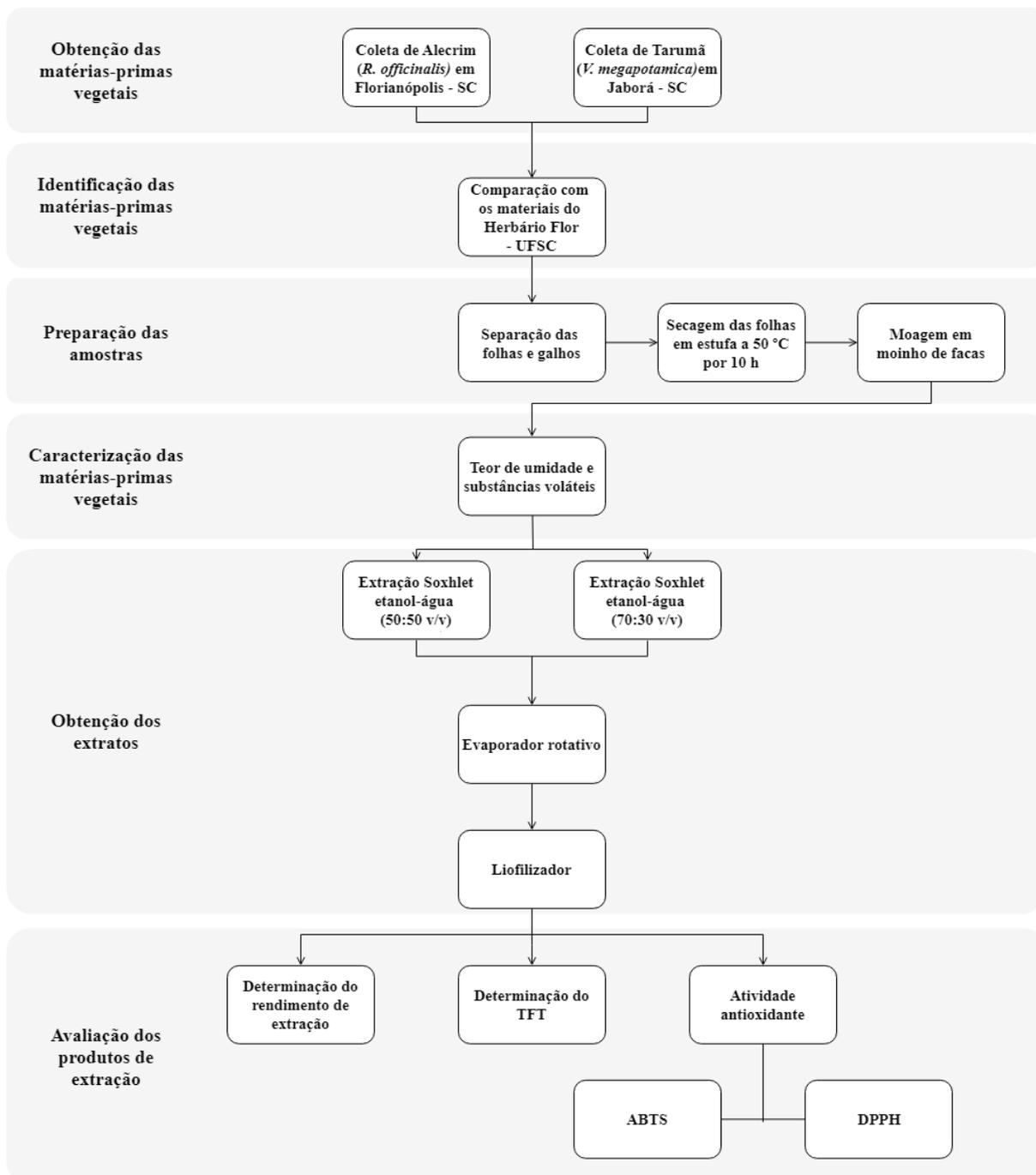
O método ABTS é um ensaio de simples operação e tem sido utilizado em diversas pesquisas para estudar a capacidade antioxidante de compostos e amostras de alimentos (CAO; PRIOR, 1998; GIL, 2000; PELLEGRINI et al., 2003; PROTEGGENTE et al., 2002). O $ABTS^{+\bullet}$ reage de forma rápida com os antioxidantes, geralmente em cerca de 30 min e pode ser usado para soluções com diferentes pH's, bem como para o estudo da influência do pH nos mecanismos antioxidantes. Além disso, o ABTS é solúvel tanto em solventes aquosos como em orgânicos, dessa forma, pode ser usado para determinar a capacidade de extrato hidrofílico e lipofílico (AWIKA et al., 2003). Sua principal limitação, comum a todos os métodos indiretos de avaliação da atividade antioxidante, é que o valor TEAC caracteriza a

capacidade da amostra estudada em reagir com o ABTS, mais do que sua capacidade de inibir o processo oxidativo (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

3 MATERIAS E MÉTODOS

As principais etapas realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho será detalhada nesta seção. A seguir um fluxograma (Figura 9) resume essas etapas, seguido do detalhamento das metodologias utilizadas.

Figura 9 – Fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho



Fonte: a autora (2018)

3.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS

O alecrim utilizado neste trabalho foi coletado em uma horta localizada na cidade de Florianópolis/SC, no mês de agosto de 2017. A matéria-prima tarumã foi coletada em Jaborá, meio oeste de Santa Catarina, no mês de setembro de 2017.

A identificação das plantas foi confirmada através de comparação com os materiais depositados no Herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina.

As matérias-primas recebidas no laboratório foram secas, separadamente, em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 50 °C por 10 h. Em seguida, objetivando maior exposição do soluto ao solvente, as folhas foram moídas em moinho de facas de aço inox (Tipo Willey, DeLeo) com malha de 20 mesh e armazenadas em freezer doméstico (Brastemp) à temperatura de -17 °C até sua utilização.

3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

O teor de umidade das amostras de alecrim e tarumã foi determinado de acordo com o método 925.09 descrito pela AOAC (2005), o qual baseia-se na perda de umidade e substâncias voláteis quando a amostra é submetida a 105 °C.

Com auxílio de uma balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), pesou-se 5 g de cada amostra, as quais foram colocadas em cadinhos de alumínio tarados previamente aquecidos em estufa (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) a 105 °C por 1 h e resfriados em dessecador. Os cadinhos contendo as amostras foram colocados em estufa a 105 °C por 3 h, seguido do resfriamento em dessecador até temperatura ambiente e aferição das massas novamente. Esse processo foi repetido a cada 30 min, até a verificação da massa constante. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi utilizada a Equação 1.

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Sendo que m_i é a massa inicial da amostra em gramas e m_f é a massa, em gramas, da amostra ao final do processo de secagem em estufa.

Realizou-se o procedimento em duplicata e o resultado foi expresso em média \pm desvio padrão.

3.3 EXTRAÇÃO SOXHLET

A extração das folhas de *R. officinalis* e *V. megapotamica* foram realizadas conforme o método 920.39C da AOAC (2005), sendo utilizado como solvente mistura etanol-água nas seguintes proporções: 50:50 (v/v) e 70:30 (v/v). Durling et al. (2007) extraíram compostos antioxidantes de Sálvia (*S. officinalis*) e verificaram melhores resultados para recuperação de antioxidantes na faixa de 55 a 75% de etanol. Tendo em vista a presença de compostos fenólicos similares em alecrim, utilizou-se misturas de etanol-água dentro da faixa indicada como de melhores resultados pelos autores. Para fins de comparação, os mesmos solventes foram utilizados para *V. megapotamica*.

O sistema Soxhlet consiste num extrator cuja parte inferior está acoplada a um balão de 250 mL contendo o solvente de extração e a parte superior a um condensador resfriado por um banho (Figura 10). Para a realização da extração, 5 g de amostra foi envolvida em cartucho de papel filme e disposta no extrator. No balão foi colocado 150 mL do solvente, o qual foi aquecido por uma manta até atingir a temperatura de ebulição.

Figura 10 – Equipamento para extração em Soxhlet



Fonte: A autora (2018)

O solvente ao entrar em ebulição, sob a forma de vapor atinge o condensador, onde resfria e condensa. A forma novamente líquida do solvente goteja sobre a matriz vegetal presente no extrator que quando completamente cheio, tem o solvente extravasado através do sifão, retornando ao balão e reiniciando o processo que teve duração de 6 h. A cada ciclo

novos compostos são solubilizados pelo solvente e tem-se a concentração desses no balão contendo o solvente. As extrações foram realizadas em duplicata.

Com o fim da extração, os balões contendo o extrato dissolvido no solvente foram submetidos ao evaporador rotativo (Fisatom, 802, São Paulo, Brasil), seguido do liofilizador (L 101, Liotop, São Carlos, Brasil) para evaporação do solvente e obtenção do extrato puro. Dessa forma, foi possível determinar a massa de extrato resultante da extração por gravimetria.

Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar, armazenados em *freezer* doméstico a -18 °C.

3.4 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO (X_0)

O rendimento global de cada extração (X_0) foi calculado através do quociente da massa da matéria extraída (m_e) por 100 g de massa inicial de matriz vegetal (m_i) conforme a Equação 2:

$$X_0 = \frac{m_e}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de *R. officinalis* e *V. megapotamica* foi determinado através da metodologia de Folin-Ciocalteu proposta por Koşar, Dorman e Hiltunen (2005).

Inicialmente, 600 µL de água destilada, 10 µL de amostra e 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu foram transferidos para *ependorfs*, os quais foram agitados. Em seguida, após um minuto, adicionou-se 150 µL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (m/v), perfez-se o volume a 190 µL com água destilada e as amostras foram incubadas por 2 h, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Ao término desse período, realizou-se a leitura da absorbância de cada uma das amostras em espectrofotômetro (800 XI, Femto, São Paulo, Brasil) em 760 nm.

A concentração média de fenóis em cada amostra foi aferida por interpolação da absorbância na curva de calibração (Apêndice I), a qual foi preparada da mesma forma descrita para as amostras, porém substituindo-as por soluções de ácido gálico com

concentrações entre 2 mg/mL e 0,031 mg/mL. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como mg de ácido gálico (GAE) por grama de extrato. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.6.1 Método DPPH

A atividade antioxidante pelo método DPPH foi determinada conforme a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Inicialmente, uma solução etanólica de DPPH com concentração de 0,3 mmol/L foi preparada e mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração. Em seguida, soluções dos extratos de *R. officinalis* e *V. megapotamica* foram preparadas com concentrações de 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 μ g/mL, com exceção do extrato de *V. megapotamica* 70:30 (v/v) cuja soluções foram preparadas em concentrações de 7,5; 20; 40; 60; 80 e 160 μ g/mL. Em *eppendorfs*, adicionou-se 0,710 μ L de amostra e 0,290 μ L da solução de DPPH, agitou-se em vórtex e após decorridos 30 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, fez-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo, SP) a 517 nm.

Compostos antioxidantes são capazes de estabilizar o radical DPPH, dessa forma, as soluções com maior concentração de antioxidantes descolorem, diminuindo a absorbância a 517 nm. De outro modo, as soluções com baixa atividade antioxidante tendem a permanecer com a coloração roxa característica do radical DPPH, apresentando, assim, maiores valores de absorbância.

Dessa forma, o cálculo do percentual de inibição das amostras sobre o radical pode ser calculado convertendo-se a absorbância em porcentual de atividade antioxidante (AA %), segundo a Equação 3:

$$AA (\%) = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \cdot 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (3)$$

Por análise de regressão linear, calculou-se a concentração mínima eficaz necessária das amostras para decrescer a quantidade de radical livre DPPH em 50% (EC_{50} – *Effective concentration*). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC_{50}) e atividade antioxidante (AA %) para os extratos analisados foram calculados a partir dos valores médios

de absorvância obtidos para cada concentração dos extratos e expressos como média \pm desvio padrão.

3.6.2 Método ABTS

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada conforme a metodologia descrita por Re et al. (1999). Preparou-se uma solução estoque contendo TROLOX (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA) e etanol para utilização como antioxidante referência.

O radical ABTS foi formado através de uma reação química com o persulfato de potássio, para isso o ABTS foi dissolvido em água até a concentração de 7,0 mM, e submetido à solução de persulfato (2,45 mM). Essa mistura foi armazenada em temperatura ambiente e protegida da luz por 16 h, tempo necessário para que a reação ocorresse e o radical fosse formado. Ao término da reação, a solução do radical ABTS^{•+} foi diluída em solução tampão de fosfato 5mM (pH 7,4) até absorvância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

Posteriormente, 10 μ L de soluções TROLOX (5 concentrações diferentes variando de 0,25 mM a 2,0 mM) foram adicionadas a 1 mL do radical ABTS em *ependorfs*. Após 45 min de reação, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro e, com isso, calculou-se a porcentagem de inibição do radical ABTS pelos padrões de TROLOX através da Equação 4:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{ABTS \text{ controle}} - A_{\text{padrão}}}{A_{ABTS \text{ controle}}} \cdot 100 \quad (4)$$

Com a equação da reta obtida, foi possível obter a porcentagem de inibição correspondente a uma concentração de 1 mM Trolox.

Da mesma forma, reagiram-se soluções dos extratos *R. officinalis* e *V. megapotamica* (5 concentrações diferentes variando de 0,1875 a 3,0 mg/mL) com o radical ABTS^{•+} e após 45 min de reação, fez-se a leitura em espectrofotômetro. Os resultados expressos como valores TEAC (mmol de Trolox/g extrato), foram calculados conforme a Equação 5:

$$TEAC = \frac{[Trolox]}{[amostra]} = \frac{1}{[amostra]} = \frac{\frac{1 \text{ mmol Trolox}}{1000 \text{ mL}}}{\frac{\text{mg amostra}}{\text{mL}} \cdot \frac{\text{g}}{1000 \text{ mg}}} = \frac{\frac{\text{mmol}}{1000 \text{ mL}}}{\frac{\text{g}}{1000 \text{ mL}}} = \text{mmol/g} \quad (5)$$

Estes valores foram obtidos a partir das diferentes concentrações de cada extrato resultando numa resposta linear entre 20 e 80 %. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Fez-se as análises estatísticas dos resultados de rendimento global de extração, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante com auxílio do software SAS® University Edition. Inicialmente, aplicou-se a análise de variância (ANOVA) e nos casos em que se verificou diferenças significativas ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados, deu-se continuidade aplicando o teste de comparação múltipla de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

Os valores de umidade e substâncias voláteis determinados para *R. officinalis* e *V. megapotamica* após a secagem estão apresentados na Tabela 1 como média \pm desvio padrão.

Tabela 1 – Teor de umidade das amostras de *R. officinalis* e *V. megapotamica* após secagem.

Matéria-prima	Teor de umidade (%)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	9,7 \pm 0,4
<i>Vitex megapotamica</i>	13,5 \pm 0,6

O teor de umidade da amostra é um dos fatores que pode influenciar a eficiência das extrações. A água pode competir com o soluto na presença do solvente, diminuindo o rendimento da extração. Por outro lado, a água pode auxiliar na extração ao provocar o inchaço das células do material vegetal e, assim, facilitar a transferência de massa (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

4.2 RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_0)

O rendimento global de extração (X_0) corresponde a quantidade total de compostos presente na matriz sólida que é possível de ser extraída pelo solvente em função das condições de extração estabelecidas (SILVA, 2004).

Os rendimentos dos extratos de *R. officinalis* e *V. megapotamica* empregando a técnica Soxhlet e utilizando misturas de etanol-água como solvente, com sua respectiva polaridade estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimentos globais de extração (X_0) obtidos para as extrações em Soxhlet de *Rosmarinus officinalis* e *Vitex megapotamica* com solventes orgânicos.

Solvente	Polaridade⁽¹⁾	X_0 (%)⁽²⁾	
		<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Vitex megapotamica</i>
Etanol/Água (50:50 v/v)	7,1	14,8 ^b \pm 0,8	16 ^b \pm 1
Etanol/Água (70:30 v/v)	6,1	21,8 ^a \pm 0,3	19,6 ^a \pm 0,7

⁽¹⁾ Índice de polaridade do solvente (MAZZUTTI, 2016).

⁽²⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Analisando a Tabela 2 percebe-se que houve maior rendimento quando utilizado o solvente com polaridade inferior (etanol 70 %) para *R. officinalis* e *V. megapotamica*, indicando a presença de grande quantidade de compostos de polaridade intermediária nessas matérias-primas. Além disso, os rendimentos obtidos para os extratos de alecrim e tarumã, em ambos os solventes, foram muito parecidos, o que sugere que tais matérias-primas apresentam compostos de características semelhantes.

Carvalho Jr et al. (2003) obtiveram um rendimento de 15 % para a extração de alecrim utilizando etanol como solvente durante 3h de refluxo. Genena et al. (2008) apresentaram rendimento de 30,25 % ao extrair alecrim pelo método Soxhlet utilizando etanol como solvente. Glisic et al. (2010) obtiveram um rendimento de 25,6 % ao extrair de partes aéreas de sálvia (*Salvia officinalis*) durante 4 h utilizando uma mistura de etanol:água (70:30) como solvente.

Baydar et al. (2009) avaliaram extratos de alecrim, coletado de junho a setembro de 2004, e verificaram variação no rendimento, na composição e na atividade antioxidante dos extratos. Sendo assim, concluíram que o estágio de desenvolvimento que a planta se encontra pode influenciar nas características do extrato. Além desse fator, as condições de preparo e o pré-tratamento ao qual as matérias primas foram submetidas podem estar associadas a essa variação no rendimento em relação aos dados descritos na literatura.

O método Soxhlet, diferentemente dos outros métodos de extração, proporciona o contato permanente da amostra com o solvente e envolve um longo período de extração, o que leva ao esgotamento da matéria-prima. Além disso, a alta temperatura do solvente (temperatura de ebulição), característica desse método, propicia redução da tensão superficial e viscosidade do solvente. Com essas propriedades físicas diminuídas, o alcance do solvente aos sítios ativos dentro da matriz é facilitado, e dessa forma, tem-se uma quantidade maior de solutos solubilizados (MARKOM et al., 2007). Esses fatores agindo concomitantemente podem ter contribuído para as porcentagens elevadas de rendimento, embora uma real avaliação sobre o método de extração só possa ser realizada quando diferentes metodologias são empregadas.

4.3 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

Os resultados de teor de compostos fenólicos totais (TFT) obtidos via Soxhlet para os extratos de *R. officinalis* e *V. megapotamica* estão apresentados na Tabela 3. A curva analítica de ácido gálico utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais encontra-se no Apêndice I.

O teor de fenólicos totais pode ser utilizado como uma estimativa da atividade antioxidante, a qual está diretamente relacionada com a estrutura química dos fenólicos (BABA; MALIK, 2015). De fato, os fenólicos são constituídos de um ou mais anéis aromáticos contendo um ou mais grupos hidroxila e são, portanto, potencialmente capazes de atuar sobre os radicais livres formando radicais fenoxila estabilizados por ressonância (DUDONNÉ et al., 2009).

Os materiais vegetais são ricos em compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, incluindo moléculas simples como antocianinas e ácidos fenólicos, e complexas como flavonoides e taninos (MAZZUTTI, 2016). Geralmente esses compostos são caracterizados como polares, e por isso são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade. No entanto, podem apresentar uma ampla faixa de polaridade, sendo também solubilizados em solventes de menor polaridade, tais como hexano e CO₂ (ANDRADE, 2011).

Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expresso em equivalentes de ácido gálico, para extração em Soxhlet de *Rosmarinus officinalis* e *Vitex megapotamica*.

Solvente	TFT (mg GAE/g extrato) ⁽¹⁾	
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Vitex megapotamica</i>
Etanol/Água (50:50 v/v)	147,4 ^b ± 1,4	170 ^a ± 7
Etanol/Água (70:30 v/v)	175,5 ^a ± 4,3	151,1 ^b ± 3,9

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p < 0,05).

Observa-se na Tabela 3 que os extratos de alecrim e tarumã apresentaram elevado teor de compostos fenólicos. Além disso, houve diferença significativa entre o teor de fenólicos dos extratos obtidos com solventes diferentes, o que pode ser observado tanto para *R. officinalis* quanto para *V. megapotamica*. Entretanto, os resultados mostram maior teor de fenólicos extraídos de *R. officinalis* quando empregado o solvente de menor polaridade (etanol 70 %), enquanto *V. megapotamica* apresentou melhor resultado quando empregado

solvente de maior polaridade (etanol 50 %), ou seja, não foi possível observar uma tendência de aumento ou redução do TFT em função da polaridade do solvente empregado.

Erkan, Ayranci e Ayranci (2008) avaliaram o teor de compostos fenólicos em extrato metanólico de folha de alecrim obtido pela extração em Soxhlet e encontraram 162 mg GAE/g de extrato. O metanol apresenta índice de polaridade de 6,6 (MAZZUTTI, 2016). No presente trabalho o extrato de *R. officinalis* obtido com solvente de polaridade (6,1) inferior ao metanol, etanol/água (70:30) (v/v), apresentou valor ligeiramente superior ($175,5 \pm 4,3$) e o extrato obtido com solvente de maior polaridade (7,1), etanol/água (50:50) (v/v), apresentou valor ligeiramente inferior ($147,4 \pm 1,4$) ao observado por Erkan, Ayranci e Ayranci (2008).

Onofre et al. (2016) avaliaram os extratos de *Vitex megapotamica* e obtiveram $91,3 \pm 1,2$ GAE/g de extrato para extrato etanólico, resultado inferior ao encontrado no presente trabalho para ambos os extratos hidroalcoólico obtidos. Os elevados teores de fenólicos nesses solventes indicam que substâncias fenólicas têm elevada afinidade por solventes polares.

Segundo Durling (2007), misturas hidroalcoólicas são possivelmente os solventes mais adequados para a extração de sálvia, que assim como alecrim e tarumã pertence à família Lamiaceae, devido às diferentes polaridades dos constituintes ativos e a aceitabilidade deste solvente para o consumo humano.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos das folhas de *R. officinalis* e *V. megapotamica* para os métodos de captura do radical DPPH e de inibição do radical ABTS são apresentados na Tabela 4. As atividades antioxidantes obtidas para os extratos avaliados no presente trabalho foram comparadas com a atividade antioxidante do antioxidante sintético BHT.

Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Vitex megapotamica* e BHT através dos métodos DPPH e ABTS.

Solvente	EC ₅₀ (µg/mL) ⁽¹⁾		ABTS (µM TEAC/g) ⁽¹⁾	
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Vitex megapotamica</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Vitex megapotamica</i>
Etanol/água (50/50)	$16,0^{cd} \pm 0,7$	$19,9^c \pm 1,2$	$756,9^{ab} \pm 25,8$	$791,9^a \pm 20,5$
Etanol/água (70/30)	$12,9^d \pm 1,1$	$69,8^a \pm 2,4$	$740,2^{ab} \pm 7,8$	$713,6^b \pm 29,9$
BHT ⁽²⁾	$59,7^b \pm 1,4^{(2a)}$		$5238 \pm 236^{(2b)}$	

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

^(2a) A autora (2018); ^(2b) Cruz (2016).

O método do radical DPPH é um dos mais empregados devido à facilidade, precisão e reprodutibilidade na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas e extratos vegetais (SHAHIDI, 2015). Além disso, este método é altamente sensível, sendo capaz de detectar concentrações muito baixas dos princípios ativos (YOKOZAWA et al., 1998).

A atividade antioxidante foi apresentada em termos de EC₅₀, que expressa a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH. Sendo assim, o valor de EC₅₀ é inversamente proporcional à capacidade antioxidante de um composto, ou seja, quanto menor for o valor do EC₅₀, menor a concentração necessária para que se tenha 50 % da atividade antioxidante.

Determinou-se a atividade antioxidante do BHT, um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante, para fins de comparação com os extratos obtidos no presente trabalho. A avaliação do BHT pelo método DPPH foi realizada com a mesma metodologia empregada nos extratos.

De acordo com Reynertson, Basile e Kennelly (2005) os antioxidantes podem ser classificados da seguinte forma: muito ativos (EC₅₀ inferiores a 50 µg/mL), moderadamente ativos (EC₅₀ entre 50 e 100 µg/mL), levemente ativos (EC₅₀ entre 100 e 200 µg/mL) e inativos (EC₅₀ maiores que 200 µg/mL).

Examinando a Tabela 4, verifica-se que o extrato de *V. megapotamica* obtido com solvente etanol 70 % se classifica como moderadamente ativo e apresenta atividade antioxidante inferior ao antioxidante sintético BHT. Os demais extratos apresentaram EC₅₀ dentro da faixa de antioxidantes muito ativos e apresentaram resultado muito superior quando comparado ao BHT, o que sugere um elevado potencial antioxidante dos extratos.

Os resultados encontrados indicam que os antioxidantes extraídos de *V. megapotamica* e detectados por este método são preferencialmente mais polares, pois tiveram afinidade maior com o solvente de maior polaridade (etanol 50 %).

O resultado encontrado de EC₅₀ para extrato de *V. megapotamica* obtido com solvente etanol 70 % ($69,8 \pm 2,4$ µg/mL) foi próximo ao obtido por Onofre et al. (2016) para o extrato etanólico de *V. megapotamica* ($67,57 \pm 1,16$ µg/mL).

Os resultados encontrados para os extratos de *R. officinalis* com os diferentes solventes não apresentaram diferença significativa ao nível de 5 % de significância, isto indica que os compostos presentes nos extratos de alecrim apresentam faixa de polaridade mais ampla, variando de intermediária a alta.

Genena et al. (2008) obtiveram um valor de 15,73 µg/mL para o extrato etanólico de *R. officinalis*, próximo aos resultados obtidos no presente trabalho: $16,0 \pm 0,7$ para etanol 50

% e $12,9 \pm 1,1$ para etanol 70 %. Os resultados obtidos no presente trabalho foram superiores aos relatados por Mata et al. (2007), os quais foram $36,0 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$ para extrato etanólico e $37,3 \pm 0,7$ $\mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso de *R. officinalis*.

Torna-se difícil a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com outros dados disponíveis na literatura, tendo em vista que as particularidades na obtenção dos extratos e metodologias podem resultar em valores bastante distintos. Além disso, sabe-se que o conteúdo de compostos bioativos dos extratos sofre interferência de fatores como: condições genéticas e de crescimento, origem geográfica e as condições climáticas, data de colheita, armazenamento e processamento da planta, o que impossibilita uma real comparação (CAVERO et al., 2005).

O método do radical ABTS teve como objetivo verificar a capacidade dos extratos de alecrim (*R. officinalis*) e tarumã (*V. megapotamica*) em sequestrar o radical cátion (ABTS) comparado a um padrão antioxidante (Trolox) em uma curva dose-resposta. Este método é uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de compostos doadores de hidrogênio e de compostos terminadores de cadeias (RE et al. 1999). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 4 e expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).

Observando a Tabela 4, nota-se que os resultados obtidos pelo método ABTS para os extratos de *R. officinalis* não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Além disso, para *V. megapotamica*, identifica-se pouca variação em função do solvente, embora os resultados tenham apresentado diferença significativa ao nível de 95 % de confiança.

Kirca e Arslan (2008) obtiveram $424,39 \pm 0,96$ $\mu\text{M TEAC/g}$ de extrato metanólico de *R. officinalis*, enquanto que Mihaylova et al. (2013) encontraram 1010 $\mu\text{M TEAC/g}$ de extrato comercial de *R. officinalis*. Tais valores são bastante distintos entre eles e dos verificados no presente trabalho. Tal diferença pode ser atribuída a diversos fatores, que vão desde a matéria prima (fatores genéticos e ambientais, partes utilizadas e processamento) e diferenças na metodologia de extração empregada.

Apesar disso, os resultados encontrados no presente trabalho encontram-se dentro da faixa de valores (269,9 – 1006,7) de TEAC reportado por Shan et al. (2005) para extrato metanólico de seis plantas da família Lamiaceae estudadas pelos autores.

De acordo com a Tabela 4, os resultados obtidos para todos os extratos os extratos de *R. officinalis* e *V. megapotamica* pelo método ABTS demonstraram-se abaixo do valor mencionado para o antioxidante sintético BHT (5238 $\mu\text{M TEAC/g}$) obtido com a mesma metodologia aplicada no presente estudo.

Observando as tabelas 3 e 4 pode-se verificar uma correlação positiva entre os resultados encontrados para fenólicos totais e EC_{50} , uma vez que os extratos com maiores teores de fenólicos relacionam-se com os bons resultados de inibição do radical DPPH. Uma correlação entre fenólicos e atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS também foi verificada para os extratos de *V. megapotamica*. Tais resultados sugerem que os compostos fenólicos contribuíram significativamente para a capacidade antioxidante dos extratos analisados.

Vários autores descreveram essa correlação positiva entre compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Surveswaran et al. (2007) verificaram elevada relação entre capacidade antioxidante (DPPH) e compostos fenólicos ao avaliar 113 extratos de plantas medicinais da Índia. Mustafa et al. (2010) observaram correlação linear positiva e altamente significativa entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico total de 112 ervas medicinais.

Entretanto, alguns autores (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005; KAHKONEN et al., 1999; WONG; JEN; LAI, 2006) sugerem que nem sempre é possível correlacionar os fenólicos totais e a capacidade antioxidante. De fato, extrato de *R. officinalis* etanol 70% que apresentou maior teor de fenólicos totais ($175,5 \pm 4,3$) resultou em atividade antioxidante via ABTS ($740,2 \pm 7,8$) significativamente ($p < 0,05$) igual ao encontrado para *R. officinalis* etanol 50% ($756,9 \pm 25,8$) cujo teor de fenólicos foi significativamente ($p < 0,05$) diferente e inferior ($147,4 \pm 1,4$). Isso pode ser explicado por vários fatores, incluindo a presença de diferentes compostos ativos na planta que podem modificar a capacidade antioxidante, os efeitos sinérgicos de diferentes compostos e as condições experimentais (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007). Além de fatores estruturais, tais quais a natureza dos grupos fenólicos e as alterações causadas pela glicosilação (CHO et al., 2003).

Observando a Tabela 4 percebe-se que há uma relação direta também entre os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante (DPPH e ABTS) para ambos os materiais vegetais analisados. Tendo em vista que o extrato de *V. megapotamica* com maior atividade antioxidante (etanol 70%) pelo método DPPH ($791,9 \pm 20,5$) apresentou também melhor resultado para o método ABTS ($19,9 \pm 1,2$). Da mesma forma, os extratos de *R. officinalis* apresentaram valores sem diferença significativa para análise de DPPH e o mesmo foi observado para os valores encontrados pelo método ABTS. Esses resultados semelhantes, sugere que os dois métodos possivelmente foram capazes de quantificar os mesmos compostos.

5 CONCLUSÃO

Através desse estudo foi possível demonstrar que o emprego de *R. officinalis* e *V. megapotamica* como matéria prima para obtenção de compostos antioxidantes é promissor, podendo ser mais explorada visando sua utilização na indústria farmacêutica e de alimentos. Os melhores rendimentos de extração para *R. officinalis* ($21,8 \pm 0,3$ %) e *V. megapotamica* ($19,6 \pm 0,7$) foram obtidos com etanol 70 %.

Os extratos de *R. officinalis* apresentaram um alto conteúdo de compostos fenólicos e forte atividade antioxidante (DPPH e ABTS) para ambos os solventes utilizados, indicando que seus compostos apresentam ampla faixa de polaridade que varia de intermediária a polar.

Os extratos de *V. megapotamica* apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante (DPPH e ABTS) quando utilizado etanol 50 % como solvente, o que sugere que os compostos extraídos e responsáveis pela atividade antioxidante do extrato apresentam elevada polaridade.

O método Soxhlet é interessante para obtenção de extratos vegetais, uma vez que tem como vantagens dispensabilidade de filtração ao término da extração, simplicidade e o equipamento de baixo custo. Além disso, pode-se concluir através dos resultados obtidos que esse método é capaz de proporcionar a obtenção de extratos de elevado potencial antioxidante.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar a atividade antimicrobiana dos extratos;
- Identificar os compostos antioxidantes presentes no extrato por cromatografia;
- Avaliar o efeito dos compostos bioativos no organismo humano;
- Testar outros métodos de extração, tais como extração assistida por ultrassom e extração com fluidos supercríticos.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, E.; GILLESPIE, K. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.
- AKOH, C.; MIN, D. Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. 3. ed. Boca Raton, FL.: **CRC Press/Taylor & Francis Group**, 2008.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21(2), p. 143-152, 2013.
- AL-SEREITI, M. R., ABU-AMER K. M., SEN P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its therapeutic potentials. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37 p.124–130, 1999.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Revista Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202- 2210, 2010.
- ANDRADE, K. S. **Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arabica* L.)**. 2011. 132 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**, 2005.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química De Alimentos: Teoria e Prática**. 4. ed. Viçosa, MG, UFV, 2008. 596p.
- ARGUETA, A.; CANO, L.; RODARTE, M. Atlas of Plants from Mexican Traditional Medicine. **Indigenist National Institute**, Mexico, 1994. 1786 p.
- AWIKA, J. M.; ROONEY L. W.; WU, X.; PRIOR R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6657-6662, 2003.
- BABA, S. A.; MALIK, S. A. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. **Journal of Taibah University For Science**, v. 9, n. 4, p.449-454, 2015.
- BAYDAR, H. ÖZKAN, G.; ERBAŞ, S.; ALTINDAL, D. Yield, chemical composition and antioxidant properties of extracts and essential oils of sage and rosemary depending on seasonal variations. **ISHS Acta Horticulturae** 826, 383–389, 2009.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; Application and Analysis of the Folin-Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, p. 6852-6865, 2013.

BORRÁS-LINARES, I; STOJANOVIC, Z; QUIRANTES-PINÉ, R.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; ŠVARC-GAJIĆ, J.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO A. Rosmarinus Officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p.20585-20606, 10 nov., 2014.

BOTTERWECK, A.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38(7), p. 599–605, 2000.

BRANDT, A. P.; OLIVEIRA, L. F. S. D.; FERNANDES, F. B.; ALBA, J. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da Vitex megapotamica (Spreng) Moldenke (V. montevidensis Cham.). **Rev. bras. farmacognosia.**, João Pessoa, v. 19, n. 2a, p. 388-393, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BRUM, T. F.; BOLIGON, A. A.; FROHLICH J. K.; SCHWANZ, T. G.; ZADRA M.; PIANA, M.; FROEDER, A. L. F.; ATHAYDE, M. L. Composition and antioxidant capacity of the essential oil of leaves of Vitex megapotamica (Sprengel) Moldenke. **Natural Product Research**, v. 27, n. 8, p.767-770, abr. 2013.

BRUM, T. F.; ZADRA M.; FROEDER, A. L. F.; BOLIGON, A. A.; FROHLICH J. K.; ATHAYDE, M. L. Análise fitoquímica das folhas de Vitex megapotamica (Sprengel) Moldenke. Universidade Federal de Santa Maria. **Revista Saúde (Santa Maria)** v. 37, n. 2, p.101-106, jul/dez 2011.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CAPECKA E., MARECZEK A., LEJA M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chem** 93: 223-226, 2005.

CARVALHO Jr, R.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from rosemary (Rosmarinus officinalis): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 197-204, 2005.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF. **Embrapa Informação Tecnológica**, v. 2, 2006.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CAVERO, S.; JAIME, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary

(*Rosmarinus officinalis* L.). **European Food Research & Technology**, Madrid, v. 221, n. 3-4, p. 478-486, 2005.

CHAIYASIT, W.; ELIAS, R. J.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 299-317, 2007.

CHIAVARO, E; RINALDI, M.; VITTADINI, E.; BARBANTI, D. Cooking of pork Longissimus dorsi at different temperature and relative humidity values: Effects on selected physico-chemical properties. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 2, p. 158-165, 2009.

CHO, E. J.; YOKOZAWA, T.; RHYU, D. Y.; KIM, S. C.; SHIBAHARA, N.; PARK, J. C. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the DPPH radical. **Phytomedicine**, 10, 544-551, 2003.

CHUN, K. S.; KUNDU, J.; CHAE, I. G.; KUNDU, J. K. Carnosol: A Phenolic Diterpene With Cancer Chemopreventive Potential. **Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 2, p. 103-110, 30 jun. 2014.

CRUZ, P. N. da. Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*). 2016. 150 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2016.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre, **Artmed**, 2010.

DASO, A. P.; OKONKWO, O. J. Conventional Extraction Techniques: Soxhlet and Liquid-Liquid Extractions and Evaporation. **Analytical Separation Science**. v. 5(3), p. 1437-1468, 2015.

DECKER, E. A.; ELIAS, R. J.; MCCLEMENTS, D. J. **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications**. Oxford: Woodhead Publishing, 2010.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p.1768-1774, 11 mar. 2009.

DURLING, N. E.; CATCHPOLE, O. J.; GREY, J. B.; WEBBY, R. F.; MITCHELL, K. A.; FOO, L. Y.; PERRY, N. B. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1417-1424, 2007.

ECHEVERRIGARAY, S.; CARRER, R.; ANDRADE, L. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. Through axillary shoot proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 883-888, 2010.

ERKAN, N., AYRANCI, G., AYRANCI, E. Antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, black seed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, 110(1), 76-82, 2009.

ESKIN, N.; SHAHIDI, F. *Biochemistry of Foods*. 3. ed. Saint Louis, **Elsevier Science**, 2013. 565p.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Ingredients**. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com>>. Acesso em: 02 de abril de 2017.

FONT QUER, P. **Plantas Medicinales: El Dioscórides renovado**. Barcelona, Ediciones Península, 1999, 706p.

FRANKEL, E. N. Hydroperoxide formation. In: Frankel E.N., editor. *Lipid Oxidation*. **The Oily Press**; Dundee, Scotland, p. 23–41, 1998.

FUENTES, P. H. A. Avaliação da qualidade de óleos de soja, canola, milho e girassol durante o armazenamento. 2011. 98 f. Dissertação (Mestre em Ciência dos alimentos) - **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2011.

GARCIA, C.; MENTI, C.; LAMBERT, P. F.; BARCELLOS, T.; MOURA, S.; CALLONI, C.; BRANCO, C. S.; SALVADOR, M.; ROESCH-ELY, M.; HENRIQUES, J. A. P. Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 1, p. 281-292, 2016.

GENENA, A. K.; HENSE, H.; SMÂNIA Jr., A.; SOUZA, S. M. D. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 28, n. 2, p. 463-469, Jun 2008 .

GIL, M. I. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 4581-4589, 2000.

GLISIC, S.; IVANOVIC, J.; RISTIC, M.; SKALA, D. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. **J. Supercrit. Fluids**, 2010, 52, 62–70.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. New York, **Oxford Univ Press Inc**, 3.ed. 2001.

HAMANN, F. R.; ZAGO, A. M.; ROSSATO, M. F.; BECK, V. R.; MELLO, C. F.; BRUM, T. F. D.; CARVALHO, L. M. D.; FACCIN, H.; OLIVEIRA, S. M.; RUBIN, M. A. Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 192, p.210-216, nov. 2016.

HAUMANN. B. F. Antioxidants: firms seeking products they can label as natural. **Inform**. v. 12 p. 1002–1013, 1990.

HAWORTH, J. E. **Natural antioxidants Review**. Proceedings of the 56 th American Meat Science Association Reciprocal Meat Conference, June 15-18, p. 95-98, 2003.

HOCMAN, G. Biochemistry of Aging and Cancer. **International Journal of Biochemistry**, v. 13(6), p. 659–672, 1981.

HU, M.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). **Food Chemistry**, v. 76, p. 327-333, 2002.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chem.* 2007, 101, 410–418

KAHKONEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KIM, S.; KIM, J.; CHO, H.; LEE, H.J.; KIM, S.Y.; KIM, S.; LEE, S.; CHUN, H.S. Carnosol, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) protects nigral dopaminergic neuronal cells. **Neuroreport** v. 17, p. 1729–1733, 2006.

KIRCA, A.; ARSLAN, E. Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. **International Journal of Food Science & Technology**, 43(11), 2038–2046, 2008.

KOCHI, J.K., Oxygen radicals. In: **Kochi, J.K. (Ed.), Free Radicals**, John Wiley, New York, v. 2, p. 665-710, 1973.

KOŞAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 525–533, jul. 2005.

LOGAN, A.; NIENABER, U.; PAN, X. Lipid Oxidation: Challenges in Food System. 1. ed. Urbana, **Academic Press and AOCS Press**, 548p. 2013.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa, SP. **Instituto Plantarum**, v. 1, 2008.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487–496, 2007.

MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, Lisbon, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MAZZUTTI, S. **Extração de compostos com importância biológica provenientes de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através de técnicas ambientalmente seguras**. 2016. 168 f. Tese (Doutorado) – Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MEIRELES, M. A. A. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications. Boca Raton: **CRC Press Taylor & Francis**, 2009.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS T. C. D.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MIHAYLOVA, D.; IVANOVA, M.; BAHCHEVANSKA, S.; KRASTANOV, A. Chemical composition and antioxidant activity of ultrasound-assisted extract of the endemic plant *Haberlea rhodopensis* Friv. **Journal of Food Science and Technology**, 2013.

MUSTAFA R. A.; HAMID, A. A.; MOHAMED, S.; BAKAR, F. A. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 Selected Tropical Plants. **J Food Sci** 75: 28-30, 2010.

NGO, S.; BRAND-WILLIAMS, D.; HEAD, R. Rosemary and Cancer Prevention: Preclinical Perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 10, p. 946-954, 2011.

ONOFRE, S. B.; ABATTI, D.; TESSARO, A. A.; TESSARO, A. B. Total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity of *Vitex montevidensis* (Spreng) Moldenke - Verbenaceae. **Ciência e Natura**, v. 38, n. 3, p. 1197-1204, 2016.

PELLEGRINI, P.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; RIO, D. D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2812-2819, 2003.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; RAU, O.; TAUSCH, L.; HÖRNIG, C.; STEINHILBER, D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WERZ, O.; Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Biochem. Pharmacol.** v. 76, p. 91–97, 2008.

POKORNY J. Antioxidants in food preservation. In: Handbook of Food Preservation, Shafiur Rahman M (ed.), New York, **Marcel Dekker**, p. 309–37, 1999.

PREEDY, V. (ed.). Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. **Academic Press**, London, 2016.

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

PROTEGGENTE, A. R.; PANNALA, A. S.; PAGANGA, G.; BUREN, L. V.; WAGNER, E.; WISEMAN, S.; PUT, F. V. D.; DACOMBE, C.; RICE-EVANS, C. A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radical Res**, v. 36, p. 217-233, 2002.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S., et al (Ed.). **Food Antioxidants**. New York, NY: Marcel Dekker, p. 490, 1996.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. R.; PANNALA, A. S.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine** v.26, p.1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, n. January, p. 025–035, 2005.

REZENDE, L. C. D. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. 2010. 106 f. Tese (Doutora em Química – Área: Química Orgânica) - Universidade Federal da Bahia, 2010.

RIBEIRO, E. T. S. **Emprego de Técnicas de Extração a Alta e Baixa Pressão para Obtenção de Polifenóis Antioxidantes do Subproduto Agroindustrial de Maçã**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ROGINSK, Y. V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.+** . Comunicado Técnico 128. Embrapa, Fortaleza, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.

SCHULER P. Natural antioxidants exploited commercially. In: Hudson, B. J. F., editor. **Food antioxidants**. New York: Elsevier Applied Science. p 99–170, 1990.

SHAHIDI, F. Handbook of Antioxidants for Food Preservation. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, **Technology and Nutrition**: Number 276. 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: Regulatory status. In F. Shahidi (Ed.), Bailey's industrial oil and fat products. **John Wiley and Sons Inc**. p. 491–521, 2005.

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

SHIMANO, M. Y. H. Ação Antioxidante de Extratos de Especiarias e Suas Misturas Binárias e Ternárias Sobre a Estabilidade Oxidativa de Óleo de Soja. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, **Universidade de São Paulo**, 2012.

SILVA, D. C. M. N. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less)**. Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

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.

WANASUNDARA, P. K. P. D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects*. 6.ed., v.1, cap.11, EUA, **Wiley – Interscience**, 2005.

WASOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HES, M.; JELEN, H. H.; KORCZAK, J.; MALECKA, M.; MILDNER-SZKUDLAR, S.; RUDZIŃSKA, M.; SAMOTYJA, U.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Oxidation of lipids in food. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. v.13(54), p. 87-100, 2004.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine** v. 14, p. 508–516, 2007.

WISE GUY REPORTS. **Global Food Antioxidants Market (By Type, Sub-Types, End-Use): Trends, Opportunities and Forecasts (2016-2021)(By Type- Natural & Synthetic; By Sub-Types- Vitamin A, C, E, Rosemary Extracts , TBHQ, BHT; By End-Use- Meat, poultry, Sea Food, Beverage, Bakery, Confectionary, Packaged Food (snacks, dairy, frozen), Oils, Fats; By Region – N. America, L. America, Europe, Asia Pacific, Middle East, Africa; By Country-USA, Brazil, UK, India, China, South Africa)**. Disponível em: <<https://www.wiseguyreports.com/reports/822729-global-food-antioxidants-market-china-south-africa>> Acesso em: 15 de junho de 2017.

WONG S. P.; LAI P. L.; JEN H. W. K. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chem**. 2006; 99:775–783, 2006.

XU, D-P.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, J. J.; LI, H. B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18(1) 96, 2017.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochem. Pharmacol**. 56, 213–222, 1998.

ZANATTA, L.; DE SOUSA, E.; CAZAROLLI, L. H.; JUNIOR, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. Effect of crude extract and fractions from *Vitex*

megapotamica leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p.151-155, jan. 2007.

APÊNDICE

Apêndice 1: Curva analítica de ácido gálico

Figura 11 – Curva padrão de ácido gálico utilizada no cálculo de TFT os extratos de *R. officinalis* e *V. megapotamica*

