

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

AMÁLIA SOARES DOS REIS

**Bloatividade da *Quassia amara* L. e estabilidade oxidativa
sobre o óleo de soja**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO
2017



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



AMÁLIA SOARES DOS REIS

**Bioatividade da *Quassia amara* L. e estabilidade oxidativa
sobre o óleo de soja**

DISSERTAÇÃO

Pato Branco
2017

AMÁLIA SOARES DOS REIS

**Bioatividade da *Quassia amara* L. e estabilidade oxidativa
sobre o óleo de soja**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” - Área do conhecimento: Química de Alimentos.

Professora Orientadora: Prof.^a Dr.^a Solange Teresinha Carpes.
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marlene Capelin Ignoato.

Pato Branco
2017

R375b Reis, Amália Soares dos.
Bioatividade da *Quassia amara* L. e estabilidade oxidativa sobre o óleo de soja / Amália Soares dos Reis. -- 2017.
104 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes
Coorientadora: Profa. Dra. Marlene Capelin Ignoato
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2017.
Bibliografia: f. 95 – 104.

1. Antioxidantes. 2. Plantas medicinais. 3. Extração (Química). 4. Avaliação sensorial. I. Carpes, Solange Teresinha, orient. II. Ignoato, Marlene Capelin, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 50

Título da Dissertação

“Bioatividade da *Quassia amara* L. e estabilidade oxidativa sobre o óleo de soja.”

Autora

Amália Soares dos Reis

Esta dissertação foi apresentada às 09 horas do dia 21 de fevereiro de 2017, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em química de alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dr.^a Solange Teresinha Carpes
UTFPR/PB
Presidente

Prof.^a Dr.^a Sirlei Dias Teixeira
UTPR/PB
Examinadora

Dr.^a Priscilla Siqueira Melo
Piracicaba/SP

Prof.^a Dr.^a Jociane Ascari
UTFPR/SH
Examinadora

Visto da Coordenação

Prof.^a Dr.^a Cristiane Regina Budziak Parabocz
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Geni Luiza Vasconcelos dos Reis e Ronaldo Soares dos Reis, por terem me dado infinitos suporte, apoio e amor.

Aos meus irmãos, Anderson e Alisson, por todo amor e parceria.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Solange Teresinha Carpes, por toda dedicação, apoio e amizade durante esses anos de trabalho.

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Marlene Capelin Ignoato, por toda paciência, dedicação e carinho.

A todos meus amigos, tanto os que estavam a todo momento do meu lado, como aqueles que estavam longe mas torcendo por mim.

Ao prof.^o Dr.^o Gil Valdo José da Silva, por toda ajuda concedida para realização das análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao grupo de pesquisa coordenado pela Prof.^a Dr.^a Solange Teresinha Carpes, por toda a ajuda concedida.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos e do Departamento de Química, da UTFPR Câmpus Pato Branco, por todo ensinamento repassado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Maria Luiza Vasconcelos (*in memoriam*). Minha amada avó, que mesmo longe continuou a cuidar de mim em todos os momentos. É pra você Vó Nega, foi tudo por você! Que nunca permitiu que eu desistisse da minha formação e dos meus sonhos. Agradeço com todo meu amor tudo que fez e faz por mim.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

REIS, Amália Soares dos. **Bioatividade da *Quassia amara* L. e estabilidade oxidativa sobre o óleo de soja.** 2017. 104 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2017.

A procura cada vez maior por produtos naturais pelos consumidores, leva a uma busca intensificada por antioxidantes naturais, visando a substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria de alimentos. Essa substituição faz-se necessária devido aos efeitos danosos que essas substâncias causam a saúde. A *Quassia amara* é uma planta nativa do norte do Brasil, pertencente a família Simaroubaceae e utilizada para combater a malária e problemas gastrointestinais. Este trabalho teve como objetivo otimizar o método de extração de compostos com atividade antioxidante presentes nas folhas de *Quassia amara* por meio de um delineamento fatorial, avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana, identificar e isolar suas substâncias ativas. Foi também objetivo aplicar o extrato em óleo de soja e avaliar os efeitos na inibição oxidativa e nas características sensoriais. A melhor condição encontrada para extração de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Quassia amara* foi com o solvente metanol, a 70 °C durante 60 minutos. A análise cromatográfica revelou a presença de ácido gálico ($58,12 \mu\text{g.g}^{-1}$) e catequina ($42,4 \mu\text{g.g}^{-1}$). Por meio da análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{13}C , foi possível a identificação do alcano octadecano, o qual foi isolado pela primeira vez nas folhas de *Quassia amara*. O extrato metanólico revelou elevada atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH ($1898,02 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$), e apresentou ação inibitória frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*, com concentração inibitória mínima (CIM) de $0,625 \text{mg.mL}^{-1}$ e $0,312 \text{mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Por fim, o extrato metanólico de *Quassia amara* conseguiu retardar a oxidação do óleo de soja. Tal capacidade pôde ser confirmada tanto pelas análises químicas como também pela análise sensorial com painel de julgadores treinados quanto o sabor ranço. Em vista disso, a planta possui potencial para a substituição aos antioxidantes sintéticos amplamente utilizados na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. DPPH. Octadecano. RMN. TBARS.

ABSTRACT

REIS, Amália Soares dos. **Bioavailability of *Quassia amara* L. and oxidative stability on soybean oil.** 2017. 104 f. Master's Dissertation (Master's degree in Technology Chemical and Biochemical Process) - Federal University of Technology of Paraná, Pato Branco, PR, 2017.

The increasing demand for natural products by consumers leads to an intensified search for natural antioxidants, aimed at replacing the synthetic antioxidants used by the food industry. Such substitution is necessary because of the harmful effects these substances cause to health. *Quassia amara* is a plant native to northern Brazil, belonging to the family Simaroubaceae and used to combat malaria and gastrointestinal problems. The objective of this work was to optimize the extraction of compounds with antioxidant activity in the leaves of *Quassia amara* by means of a factorial design, to evaluate antioxidant and antibacterial activity, to identify and isolate their active substances. It was also the objective to apply the extract in soybean oil and evaluate the effects on oxidative inhibition and sensorial characteristics. The optimal condition found for extracting compounds with antioxidant activity from *Quassia amara* leaves was with solvent methanol at 70 °C for 60 minutes of extraction. Chromatographic analysis revealed the presence of gallic acid (58.12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and catechin (42.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). By means of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic analysis, it was possible to identify the alkane octadecane, which was isolated for the first time in the leaves of *Quassia amara*. The methanolic extract of *Quassia amara* showed high antioxidant activity by the sequestration method of the DPPH radical (1898.02 $\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$), and presented an inhibitory action against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella bongori* microorganisms, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.625 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.312 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Finally, the methanolic extract of *Quassia amara* was able to retard the oxidation of soybean oil. Such ability could be confirmed by both chemical analyzes and by the sensory analysis with panel of judges trained as to the rancid flavor. In view of this, the plant has potential for substitution to synthetic antioxidants widely used in the food industry.

Keywords: Antibacterial activity. DPPH. Octadecane. NMR. TBARS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da quassina e neoquassina.	22
Figura 2 - Mecanismo da oxidação lipídica.	25
Figura 3 - Classificação dos antioxidantes.	26
Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides.	29
Figura 5 - Estabilização do radical DPPH.....	30
Figura 6 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	31
Figura 7 - Estrutura do ácido linoleico (a) e do β -caroteno (b)	32
Figura 8 - Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+}	33
Figura 9 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído, produzindo um composto de coloração vermelha (cromogênio) medido a 532 nm.	35
Figura 10 - Fluxograma das atividades a serem desenvolvida.....	37
Figura 11 - Modelo de ficha utilizado na Análise Sensorial (teste discriminativo com escala não estruturada de 10 cm e teste de ordenação).	49
Figura 12 - Gráfico de Pareto para a análise de Fenólicos Totais com a amostra <i>Quassia amara</i>	55
Figura 13 - Gráfico de Pareto para a análise de DPPH com a amostra <i>Quassia amara</i>	55
Figura 14 - Distribuição dos resultados obtidos na análise de Fenólicos totais em torno da reta que indica normalidade.	56
Figura 15 - Distribuição dos resultados obtidos na análise de DPPH em torno da reta que indica normalidade.	56
Figura 16 - Gráfico de Superfície referente a atividade antioxidante em função as variáveis temperatura (°C) e solvente.	57
Figura 17 - Gráfico de Superfície referente a atividade antioxidante em função as variáveis tempo (minutos) e solvente.	58
Figura 18 - Gráfico de Superfície referente a atividade antioxidante em função as variáveis tempo (minutos) e temperatura (°C).	58
Figura 19 - Gráfico de Superfície referente a Compostos Fenólicos em função as variáveis temperatura (°C) e solvente.	59

Figura 20 - Gráfico de Superfície referente a Compostos Fenólicos em função as variáveis tempo (minutos) e solvente.....	59
Figura 21 - Gráfico de Superfície referente a Compostos Fenólicos em função as variáveis tempo (minutos) e temperatura (°C).....	60
Figura 22 - Cromatograma do extrato metanólico de Quassia amara.....	61
Figura 23 – Fluxograma das atividades desenvolvimentos para a obtenção das frações hexânica (FHQa), acetato de etila (FACQa) e metanólica (FMQa).....	64
Figura 24 – Espectro de Infravermelho da amostra Qa 1.....	67
Figura 25 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 500,13 MHz) da Qa 1.....	67
Figura 26 – Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ ; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.....	69
Figura 27 – Espectro DEPT (CDCl ₃ ; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.....	69
Figura 28 – Mapa de contornos COSY (CDCl ₃ ; 500,13 MHz) da Qa 1.....	70
Figura 29 – Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ ; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.....	70
Figura 30 – Mapa de contornos HMQC (CDCl ₃ ; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.....	71
Figura 31 – Estrutura do composto Qa 1, identificado como octadecano.....	72
Figura 32 - Análise de CIM para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	77
Figura 33 - Análise de CIM com a bactéria <i>Salmonella Bongori</i>	78
Figura 34 - Valores de TBARS do óleo de soja refinado submetido aos diferentes tratamentos.....	86
Figura 35 - Valores da análise sensorial dos tratamentos avaliados quanto ao sabor ranço.....	90
Figura 36 - Valores da análise sensorial dos tratamentos avaliados quanto ao gosto amargo.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição de ácidos graxos do óleo de soja.	23
Tabela 2 - Condições e Variáveis utilizados na otimização da extração de compostos com atividade antioxidante de Quassia amara.	37
Tabela 3 - Planejamento fatorial para otimização da extração de compostos com atividade antioxidante de Quassia amara.	39
Tabela 4 - Resultados referentes ao delineamento fatorial para compostos fenólicos e DPPH determinados em <i>Quassia amara</i>	50
Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para a variável dependente Fenólicos Totais em <i>Quassia amara</i>	53
Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para a variável dependente DPPH em <i>Quassia amara</i>	54
Tabela 7 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes compostos fenólicos e DPPH em função dos fatores solvente, tempo e temperatura.	56
Tabela 8 – Sub-frações obtidas por meio do fracionamento e purificação da FAcQa com coluna cromatográfica.	65
Tabela 9 - Resultados referentes a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e β -caroteno para o extrato metanólico de <i>Quassia amara</i>	72
Tabela 10 - Acidez (mg KOH.g^{-1}) dos quatro tratamentos de óleo de soja refinado mantidos em estufa a 65 ± 2 °C por 96 horas.	79
Tabela 11- Absortividade no UV em 232 e 270 nm dos quatro tratamentos de óleo de soja refinado mantidos em estufa a 65 ± 2 °C por 96 horas.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% AA	Atividade Antioxidante (%)
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
FAcQa	Fração Acetato de etila de <i>Quassia amara</i>
FHQa	Fração Hexânica de <i>Quassia amara</i>
FMQa	Fração Metanólica de <i>Quassia amara</i>
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	Equivalente em ácido gálico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
mg GAE.g ⁻¹	Miligrama equivalente em ácido gálico por grama de amostra
PG	Propil galato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TROLOX	6- hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	19
3.2 <i>Quassia amara</i>	19
3.3 ÓLEO DE SOJA E SEU PROCESSO OXIDATIVO	21
3.4 ANTIOXIDANTES.....	24
3.4.1 Antioxidantes sintéticos.....	26
3.4.2 Antioxidantes naturais.....	27
3.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	29
3.5.1 Método Captura do Radical livre DPPH [•]	29
3.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS ^{•+}	30
3.5.3 Determinação da Atividade Antioxidante Total utilizando o Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico.....	31
3.5.4 Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).....	31
3.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	32
3.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E PREPARO DA AMOSTRA.....	37
4.2 EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO FATORIAL.....	37
4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	39
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
4.4.1 Atividade de sequestro do radical DPPH [•]	39
4.4.2 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	40
4.4.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	40

4.4.4 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	41
4.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	41
4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	42
4.5.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	42
4.6 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO CLAE.....	43
4.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	43
4.8 APLICAÇÃO DO EXTRATO EM ÓLEO DE SOJA REFINADO.....	44
4.8.1 Testes de oxidação.....	44
4.8.1.1 Teste acelerado de estufa ou Schaal Oven Test.....	44
4.8.1.2 Índice de acidez (IA).....	45
4.8.1.3 Determinação da extinção específica por absorção na região ultravioleta (UV).....	45
4.8.1.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	46
4.8.2 Análise Sensorial	46
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	49
5.1 DELINEAMENTO FATORIAL.....	49
5.1.1 Análise de variância (ANOVA) Superfície de resposta.....	51
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>Quassia amara</i>	60
5.2.1 Identificação de Compostos Fenólicos utilizando CLAE.....	60
5.2.2 Isolamento e identificação de substâncias	63
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	71
5.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	74
5.5 APLICAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>Quassia amara</i> EM ÓLEO DE SOJA.....	77
5.5.1 Índice de acidez.....	78
5.5.2 Determinação da extinção específica por absorção na região ultravioleta (UV).....	80
5.5.3 TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido 2-tiobarbitúrico).....	83
5.5.4 Análise Sensorial.....	86
6 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados visando principalmente o alívio ou cura de doenças, podendo ser usados também como complemento em diversos tratamentos.

Entre as plantas medicinais, a *Quassia amara*, pertencente a família Simaroubaceae, destaca-se pelo seu amplo uso na medicina popular, sendo largamente utilizada na região da Amazônia contra malária, e empregada também como inseticida, tônico contra febre e hepatite, recomendada para diarreias, prisão de ventre, anemias, problemas estomacais e gastrointestinais (LORENZI; MATOS 2008).

Dentre os seus constituintes químicos, destacam-se os quassinoides (GILBERT; FAVORETO, 2010), que são triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, os quais apresentam uma ampla faixa de atividade biológica, sobressaindo propriedades anticâncerígenas, antimalárica, inseticida, antiviral e antioxidante (ALMEIDA, 2007).

Atualmente, devido à tendência cada vez maior pela procura de produtos naturais pelos consumidores, e, juntamente com os efeitos danosos que os antioxidantes sintéticos causam a saúde (JORGE et al., 2009; PITARO; FIORANI; JORGE, 2012; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015), levando-os a sua proibição em diversos países (BOROSKI et al., 2015), a busca por antioxidantes naturais intensificou-se, visando principalmente a substituição dos antioxidantes sintéticos amplamente utilizados pela indústria de alimentos (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

A indústria alimentícia faz uso de antioxidantes sintéticos em inúmeros produtos, entretanto, devido sua composição com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, o óleo de soja é um produto alimentício muito suscetível a oxidação lipídica, sendo esta inibida ou retardada por meio da adição de antioxidantes sintéticos. Por resistir ao aquecimento, o mais utilizado é o terc-butilhidroquinona (TBHQ), entretanto, em experimentos, este tem demonstrado a possibilidade de apresentar efeito carcinogênico, entre outros efeitos indesejáveis à saúde (LUZIA; JORGE, 2009).

Desse modo, este trabalho tem como objetivo otimizar o método de extração de compostos com atividade antioxidante presentes nas folhas de *Quassia amara*

utilizando o delineamento fatorial, identificar e isolar suas substâncias, investigar sua atividade antioxidante e antibacteriana, e aplicar o extrato em óleo de soja visando a substituição de antioxidantes sintéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi otimizar o método de extração de compostos com atividade antioxidante presentes nas folhas de *Quassia amara* utilizando o delineamento fatorial, caracterizar o extrato, investigar sua atividade antioxidante e antibacteriana, e posteriormente, aplicar o extrato em óleo de soja visando a substituição de antioxidantes sintéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração de compostos com atividade antioxidante presentes nas folhas de *Quassia amara*;
- Identificar/quantificar compostos fenólicos presentes no extrato de *Quassia amara* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Purificar o extrato por meio de fracionamento e Cromatografia em Coluna (CC);
- Analisar por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), as frações ascendentes da CC;
- Identificar os compostos isolados por espectroscopia no Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Avaliar as propriedades antioxidantes do extrato pelos métodos sequestro do radical DPPH e ABTS, poder de redução do ferro (FRAP) e auto oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico;
- Determinar a atividade antibacteriana pelos métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato de *Quassia amara*;

- Aplicar diferentes concentrações do extrato liofilizado (100 e 200 ppm) em óleo de soja isento de antioxidante sintético;
- Avaliar a oxidação lipídica do óleo de soja por meio de teste acelerado em estufa através dos testes químicos índice de acidez, absorvidade na faixa do ultravioleta (UV) e TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico);
- Avaliar a oxidação do óleo utilizando teste discriminativo com escala não estruturada de 10 cm e teste de ordenação para a análise sensorial com quadro de julgadores treinados para sabor ranço.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Relatos sobre a utilização de plantas medicinais se faz presente ao longo de toda história da humanidade. Entretanto, pesquisas sobre seus princípios ativos só ocorreram por volta do século XIX, quando Friedrich Serturner isolou pela primeira vez o alcaloide morfina presente na papoula. E, posteriormente, foram isolados vários compostos como a codeína, papaverina, atropina e salicina que marcaram a indústria farmacêutica global (DUTRA et al., 2016). Desde então, grandes foram os avanços nesta área, contribuindo para o cenário econômico mundial e brasileiro (CECILIA et al., 2012; CERCATO et al., 2015; DUTRA et al., 2016).

O Brasil possui uma vasta biodiversidade de plantas medicinais, representando de 20 a 22% de todas as espécies conhecidas (DUTRA et al., 2016). Conseqüentemente, muitos compostos atualmente já isolados foram a partir de plantas nativas brasileiras (VALLI et al., 2013).

Apesar de toda biodiversidade, as pesquisas com plantas medicinais visando a descoberta de novos princípios ativos, ainda são, na sua maioria, restritas as universidades, justificando um crescente aumento no número de publicações a respeito deste tema, mas, o mercado derivado destes produtos ainda se mostra pequeno em relação a sua real capacidade (DUTRA et al., 2016).

3.2 *Quassia amara*

Quassia amara é uma árvore que pertence à família Simaroubaceae, caracterizada pela bioprodução de princípios amargos (ALMEIDA et al., 2007). É um arbusto grande (2 a 8 metros de altura), suas flores são avermelhadas e seus frutos são drupas com cerca de 1 a 2 cm (GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011). Alguns dos seus nomes comuns são pau-amargo, pau-amarelo, pau-quassia, quassia-amarga (GILBERT; FAVORETO, 2010). Cresce normalmente nas regiões

tropicais da América, do México ao norte da América do Sul, incluindo a Amazônia (GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011; GILBERT; FAVORETO, 2010).

É uma das plantas mais citadas em etnomedicina para o tratamento da malária, principalmente no Suriname, Guiana e Guiana Francesa (BERTANI et al., 2007; GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011). Tem sido empregada na medicina tradicional para combater a malária (BERTANI et al., 2006, 2007), problemas gastrointestinais, desordens do fígado, males da vesícula, diabetes, inseticida contra piolhos (ALCALDE; POZO, 2007), infecções por bactérias, anemia e picadas de cobras (GILBERT; FAVORETO, 2010; HERNANDEZ, 2008).

A família Simaroubaceae possui cerca de 32 gêneros e mais de 170 espécies tipicamente tropicais (ALVES et al., 2014; MACEDO; POTIGUARA; NETO, 2005). No Brasil, está representada pelos gêneros Quassia, Picrolemma, Castela, Picrasma, Simaba e Simarouba (ALMEIDA et al., 2007; ALVES et al., 2014).

Devido a sua diversidade de espécies, desde 1930 a família *Simaroubaceae* tem sido fonte de estudo (ALMEIDA et al., 2007; ALVES et al., 2014), e inúmeros compostos vêm sendo isolados e suas estruturas elucidadas. Dentre eles quassinoides, alcaloides, triterpenos, esteroides, cumarinas, antraquinonas e flavonoides (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011).

Suas espécies destacam-se por conterem substâncias amargas, conhecidas como quassina, nome dado a uma classe de compostos estruturalmente relacionados, denominados de quassinoides (ALMEIDA et al., 2007).

Os quassinoides são triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação e são encontrados quase que exclusivamente nas plantas que constituem a família Simaroubaceae, sendo assim, considerados marcador taxonômico da mesma (NUNOMURA et al., 2012). Segundo Almeida et al. (2007), os primeiros quassinoides isolados, em 1835, foram encontrados na madeira da espécie *Quassia amara*, a quassina e a neoquassina (Figura 1), e atualmente há cerca de 200 quassinoides conhecidos (ALVES et al., 2014).

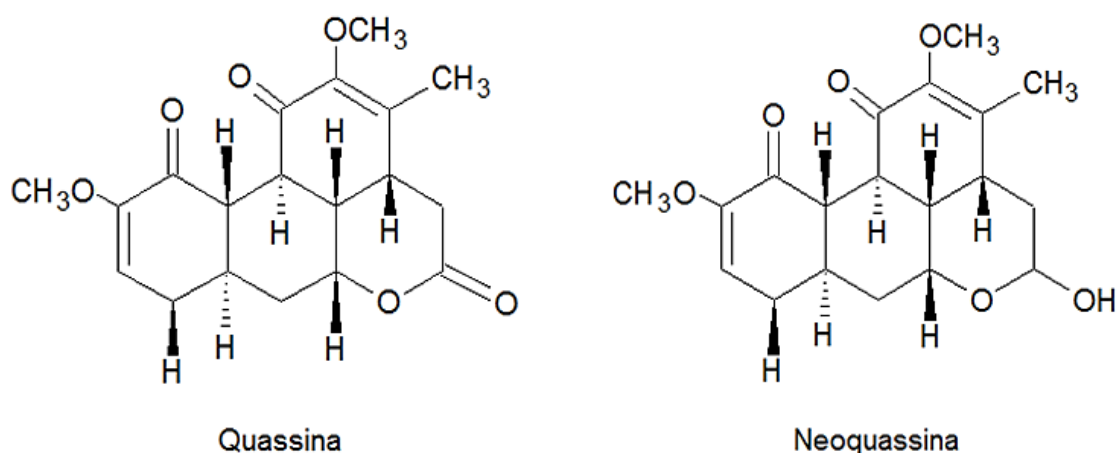


Figura 1 - Estrutura da quassina e neoquassina.
Fonte: Adaptado ALVES et al. (2014).

Os quassinoides apresentam inúmeras atividades biológicas como anticâncer, antimalárica, fitotóxica, inseticida, antiviral, antiúlcera, antituberculose, afrodisíaco, antifertilidade masculina, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (ALMEIDA et al., 2007).

Além dos quassinoides, dentre os principais constituintes da *Quassia amara* estão os alcaloides indólicos, esteroides, ácidos alifáticos e ácidos aromáticos (GILBERT; FAVORETO, 2010).

Devido a seus compostos com ampla atividade e pela possibilidade de larga utilização em diversas áreas como agrícola, pecuária, médica e alimentícia, a *Quassia amara* vem despertando grande interesse da comunidade científica e impulsionando vários estudos.

3.3 ÓLEO DE SOJA E SEU PROCESSO OXIDATIVO

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, resultantes da esterificação entre glicerol e ácidos graxos, mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, tocoferol, proteínas, esteróis e vitaminas (KAWAZOS, 2014).

O óleo de soja é o óleo mais utilizado no mundo, e o Brasil se destaca no cenário mundial como segundo maior produtor e exportador dos grãos de soja (KAWAZOS, 2014; PIRES et al., 2015).

Dentre os constituintes do óleo de soja (Tabela 1) estão os ácidos graxos poli-insaturados linoleico e linolênico, os quais são essenciais ao organismo e não são sintetizados pelo corpo humano (PIRES et al., 2015).

Tabela 1- Composição de ácidos graxos do óleo de soja.

Ácidos graxos	Nomenclatura	Composição (g/100g)
C<14		ND – 0,1
C 14:0	Mirístico	ND – 0,2
C 16:0	Palmítico	8,0 – 13,5
C 16:1	Palmitoleico	ND – 0,2
C 18:0	Estearico	2,0 – 5,4
C 18:1	Oleico	17,0 – 30,0
C 18:2	Linoleico	48,0 – 59,0
C 18:3	Linolênico	4,5 – 11,0
C 20:0	Araquídico	0,1 – 0,6
C 20:1	Eicosenoico	ND – 0,5
C 22:0	Behênico	ND – 0,7

Fonte: CODEX ALIMENTARIUS (2016).

A diferença na composição e no grau de instauração dos ácidos graxos presentes nos óleos podem alterar propriedades físico-químicas e interferir diretamente em sua degradação, uma vez que, os que possuem maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados estão mais suscetíveis à oxidação quando comparados aos que possuem maior quantidade de ácidos graxos saturados (CORSINI; JORGE, 2006; RIOS; PEREIRA; ABREU, 2013).

Além de sua composição, fatores como luz, temperatura, oxigênio, presença de metais, peróxidos, compostos termicamente oxidados e pigmentos influenciam, isolados ou juntos, na oxidação do óleo (CHOE; MIN, 2006). Tal processo acarreta na perda de vitaminas e ácidos graxos essenciais, afeta a qualidade sensorial do óleo de soja, alterando cor, textura e sabor, diminuindo sua vida útil (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2007).

De maneira geral, o processo de deterioração, ou rancificação, pode ocorrer por meio de reações hidrolíticas ou reações de oxidação.

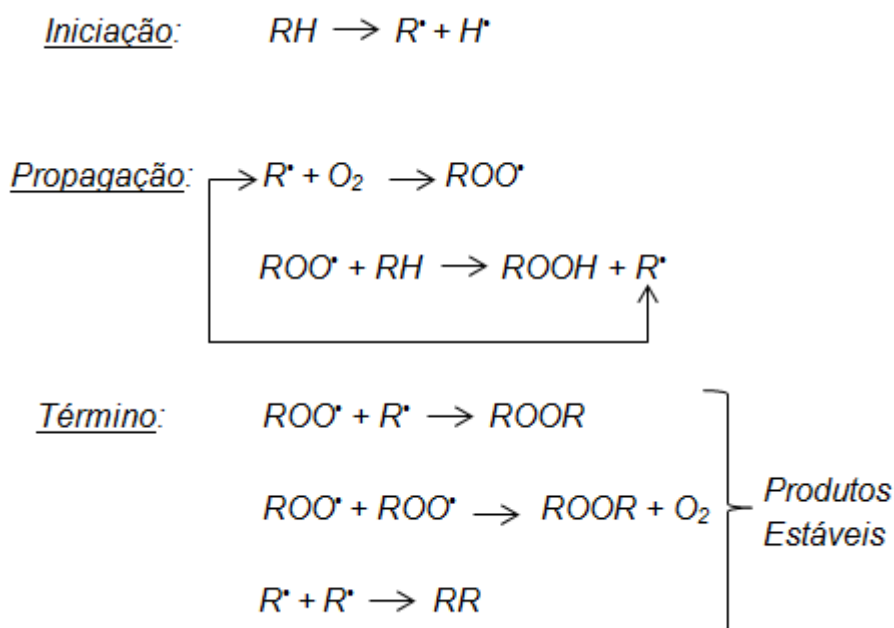
A rancidez hidrolítica ocorre por meio da ação de enzimas ou agentes químicos que rompem a ligação éster dos lipídeos, liberando ácidos graxos. A presença de água acelera a rancidez hidrolítica alterando propriedades organolépticas como cor e odor (RAMALHO; JORGE, 2006; WANKENNE, 2014).

A rancidez oxidativa pode ocorrer por ação enzimática ou não enzimática (fotooxidação e autooxidação).

Por via enzimática, a oxidação ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases resultando na formação de peróxidos e hidroperóxidos precedendo a reações degradativas.

A fotooxidação é ocasionada pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina, entre outros) que absorvem a energia luminosa e transferem para o oxigênio tripleto, gerando o estado singleto. Estes formam hidroperóxidos que por degradação originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (MOREIRA, 2016; RAMALHO; JORGE, 2006).

A autooxidação é o principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras, e ocorre em três etapas distintas (Figura 2). Na etapa de iniciação, em condições favorecidas por luz e calor, ocorre a formação de radicais livres devido a retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo. Na etapa seguinte, propagação, o radical livre reage com o oxigênio molecular, formando um radical livre peróxido. Este, por sua vez, reage com outra molécula insaturada para a formação de um hidroperóxido e um radical livre, capaz de iniciar uma reação em cadeia. A terminação é determinada pela reação dos radicais livres entre si, formando produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) (MOREIRA, 2016; RAMALHO; JORGE, 2006; WANKENNE, 2014).



Onde:
RH: Ácido graxo insaturado;
R[•]: Radical livre;
ROO[•]: Radical peróxido;
ROOH: Hidroperóxido.

Figura 2 - Mecanismo da oxidação lipídica.
 Fonte: Adaptado RAMALHO; JORGE (2006).

3.4 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes podem ser definidos como moléculas capazes de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas, tendo atuação em alimentos ou em sistemas biológicos (BOROSKI et al., 2015).

Segundo Messias (2009), os mecanismos de ação dos antioxidantes podem ser divididos em: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos.

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

butilhidroquinona (TBHQ), e propil galato (PG), além dos tocoferóis que são naturais (MESSIAS, 2009).

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

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

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

Os agentes quelantes agem nos alimentos complexando os íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (MESSIAS, 2009).

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

Diversos são os compostos que apresentam capacidade antioxidante, sendo estes classificados de acordo com sua origem natural ou sintética (Figura 3).

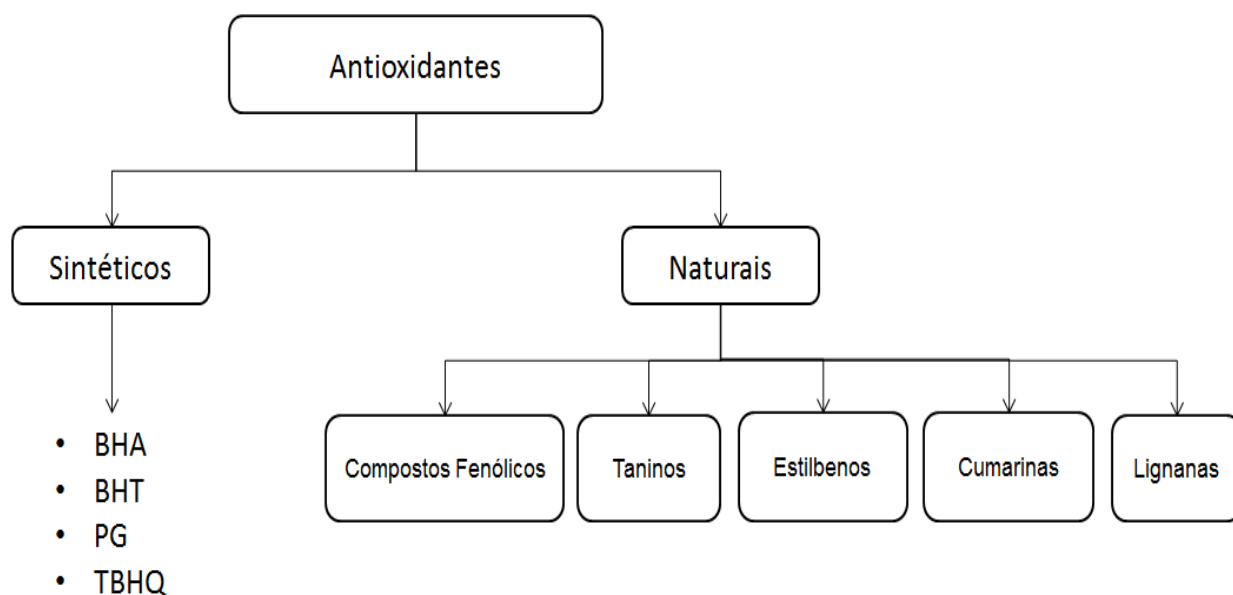


Figura 3 - Classificação dos antioxidantes.
 Fonte: Adaptado de SHAHIDI; AMBIGAIPALAN (2015).

3.4.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são adicionados em matrizes alimentares para retardar o aparecimento de alterações oxidativas durante as etapas de fabricação, processamento, preparação, tratamento, transporte, armazenamento e manipulação (BOROSKI et al., 2015).

Atualmente, os antioxidantes sintéticos que têm seu uso autorizado são os compostos fenólicos BHA, BHT, TBHQ e PG (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

O *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) é o comitê científico internacional de especialistas em aditivos alimentares, administrado pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e pela OMS (Organização Mundial da Saúde), responsável por estabelecer a Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos antioxidantes, com base em estudos toxicológicos (ANVISA, 2016). Podendo, por meio disto, disponibilizar listas dos aditivos com os limites máximos permitidos para as indústrias.

Estudos recentes demonstram que, em determinadas quantidades, o uso desses antioxidantes sintéticos apresentam efeitos danosos à saúde (JORGE et al., 2009; PITARO; FIORANI; JORGE, 2012; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015), levando-os a sua proibição em diversos países (BOROSKI et al., 2015). Em razão

disto, o uso desses antioxidantes em alimentos está cada vez mais restrito, intensificando a busca por antioxidantes naturais.

3.4.2 Antioxidantes naturais

A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais em alimentos vem crescendo atualmente, pois além de manter as propriedades organolépticas e químicas dos alimentos, os antioxidantes naturais ainda trazem benefícios a saúde, como a prevenção de doenças.

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

Os tocoferóis são encontrados naturalmente na maioria dos óleos vegetais, e sua atividade antioxidante deve-se principalmente a capacidade de doar seus átomos de hidrogênio fenólico a radicais livres lipídicos (MESSIAS, 2009).

Os antioxidantes mais abundantes na natureza pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, as quais possuem no mínimo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (BOROSKI et al., 2015). Sua atividade antioxidante deve-se principalmente à sua estrutura química e suas propriedades redutoras, pois são estas características que conferem fundamental importância na neutralização ou sequestro de radicais livres e como quelantes de metais de transição, agindo desde a etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007). Estes se dividem em duas subclasses, ácidos fenólicos e flavonoides.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes (MESSIAS, 2009).

A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 4) (ANGELO; JORGE, 2007). São

compostos largamente encontrados no reino vegetal, e a relação entre sua estrutura e capacidade antioxidante geralmente está associada com um grupo *o*-dihidroxila no anel B, com a presença de dupla ligação entre os carbonos C2-C3 juntamente com um grupo oxo e grupos hidroxilas nas posições C3 e C5 (BOROSKI et al., 2015).

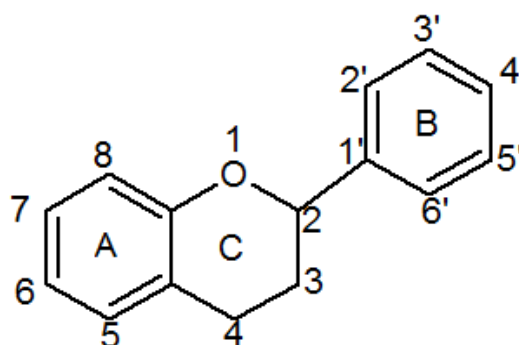


Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides.
Fonte: Adaptado ANGELO; JORGE (2007).

Os taninos são subdivididos em condensados e hidrolisáveis, de acordo com sua estrutura. Taninos condensados também são conhecidos como proantocianidinas e são moléculas de grande interesse devido seu potencial antioxidante e efeitos benéficos à saúde. Os taninos hidrolisáveis são encontrados principalmente em legumes e vegetais folhosos (OSZMIANSKI et al., 2007; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Na classe dos estilbenos destaca-se o resveratrol, ao qual são atribuídas propriedades antioxidantes, anticancerígenos e antitumorais (LOBO et al., 2010; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

As cumarinas podem ser encontradas em vegetais, fungos e bactérias. Com propriedades farmacológicas, bioquímicas e terapêuticas (RADÜNZ et al., 2012).

As lignanas tendem a ser encontradas em alimentos ricos em fibras, e destacam-se por sua capacidade antioxidante e diminuição do risco de desenvolvimento de câncer (CORDEIRO; FERNANDES; BARBOSA, 2009).

3.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Método Captura do Radical livre DPPH[•]

O método do radical DPPH[•] é aplicado em diferentes matrizes como frutas, vegetais, plantas, temperos, cereais e algas (BOROSKI et al., 2015). Tem sido amplamente utilizado devido sua facilidade e alta sensibilidade (BOROSKI et al., 2015; SUCUPIRA et al., 2012).

Consiste na capacidade do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) formar radicais livres estáveis em solução etanólica (BISWAS; KONDAIAH; ANJANEYULU, 2006), de coloração púrpura característica, que na presença de um composto com atividade antioxidante, perde a coloração e sua intensidade de absorção diminui, de acordo com o número de elétrons capturados (SUCUPIRA et al., 2012), formando o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (Figura 5).

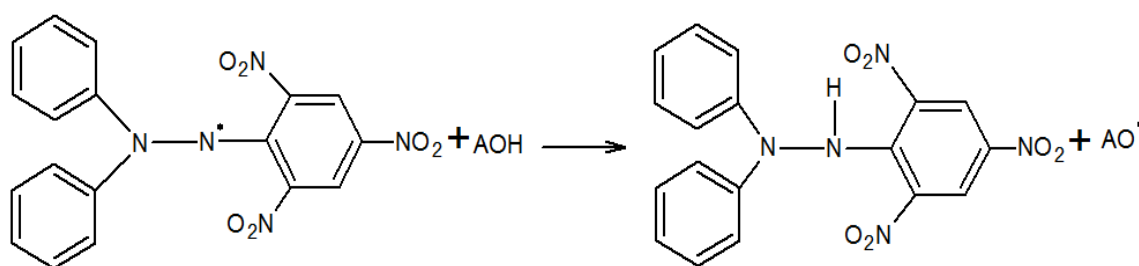


Figura 5 - Estabilização do radical DPPH.
Fonte: Adaptado RUFINO et al. (2007).

O radical DPPH[•] possui uma absorção característica na faixa de 515 - 520 nm, e, após sua redução por um hidrogênio doado por um composto antioxidante, ocorre um decréscimo na intensidade da absorção.

A atividade antioxidante avaliada pode ser expressa como coeficiente de inibição (CI₅₀, a qual expressa a quantidade de antioxidante capaz de desativar 50% dos radicais livres presentes no meio reacional), no tempo em que atingir a estabilidade determinada através de uma cinética, ou utilizando uma curva padrão

de Trolox, um composto sintético hidrossolúvel estruturalmente similar à vitamina E, que é lipossolúvel (RUFINO et al., 2006).

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

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

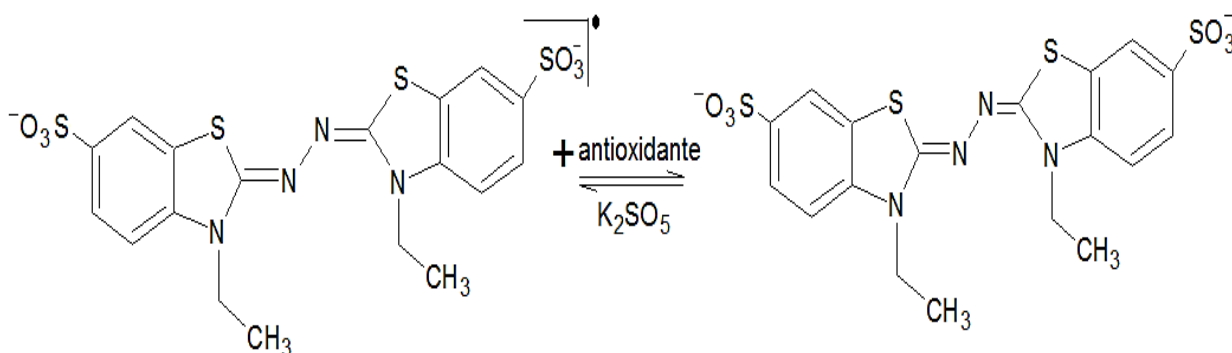


Figura 6 - Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: Adaptado RUFINO et al. (2007).

Este método pode ser empregado em matrizes de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

A atividade antioxidante da amostra é medida por meio da capacidade da amostra de estabilizar o cátion radicalar ABTS presente na solução, voltando a forma de seu composto neutro. Tal reação ocasiona a descoloração da solução e diminuição da absorbância a 734nm (BOROSKI et al., 2015).

A capacidade antioxidante da amostra é calculada em relação à atividade do antioxidante sintético Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), nas mesmas condições, e os resultados são expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox ($\mu\text{mol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$ de amostra).

3.5.3 Determinação da Atividade Antioxidante Total utilizando o Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico

O método é utilizado principalmente em alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes e cereais. O β -caroteno (Figura 7-b) é um carotenoide, com absorção máxima em 470nm e coloração amarela, e devido sua estrutura, é muito suscetível à oxidação. Esse tipo de avaliação da atividade antioxidante é realizado em meio emulsionado com ácido linoleico (Figura 7-a), que na presença de O_2 ocorre formação de radicais peroxila. Os radicais atacam o β -caroteno e provocam sua descoloração. Com a presença de um antioxidante, o consumo do β -caroteno é diminuído e a coloração é mantida. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição da oxidação (BOROSKI et al., 2015; KUMAZAWA et al., 2002).

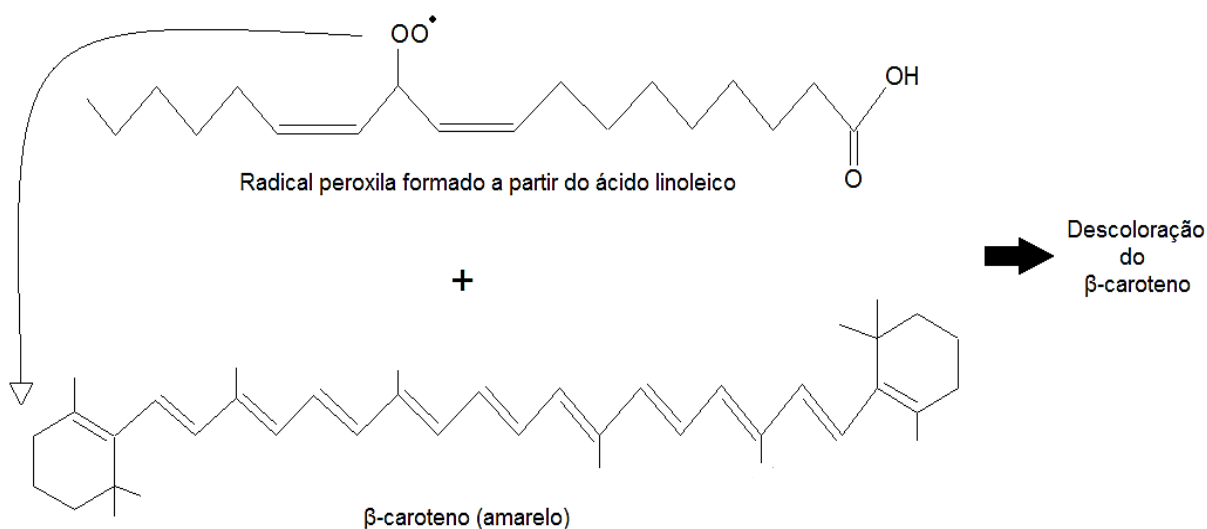


Figura 7 - Estrutura do radical peroxila formado a partir do ácido linoleico (a) e do β -caroteno (b).

Fonte: Adaptado ALVES et al. (2010).

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

O método FRAP (*Ferric Reduction Antioxidant Power*), consiste na redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ), a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} TPTZ),

em meio ácido, pelos agentes antioxidantes. Esta redução pode ser acompanhada pela coloração azul intensa apresentada pelo complexo de Fe^{2+} (Figura 8), com absorção na região de 593 nm (RUFINO et al., 2006).

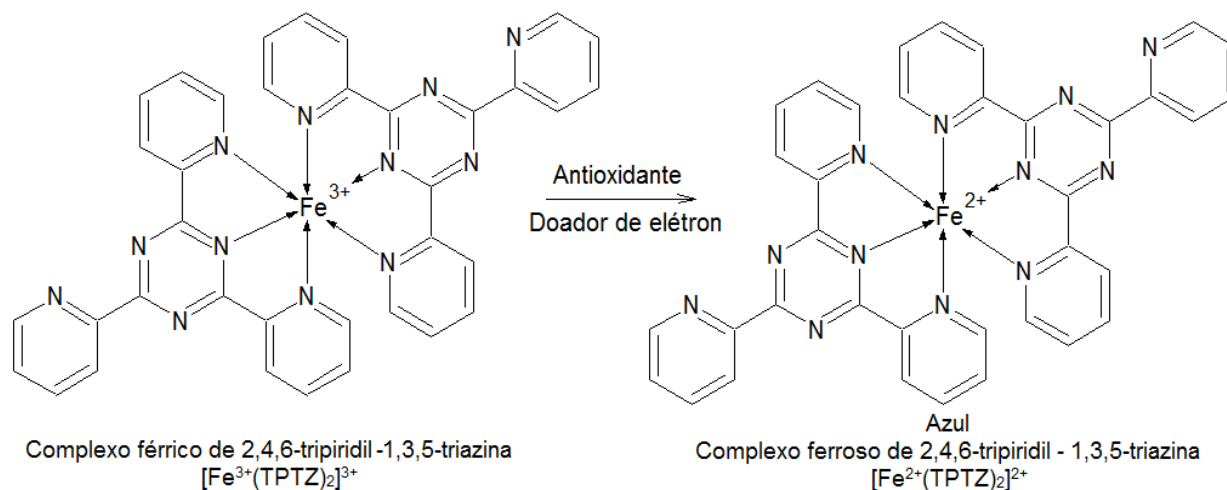


Figura 8 - Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+} .
 Fonte: Adaptado RUFINO et al. (2006).

As absorbâncias devem ser medidas após o tempo de 30 minutos em espectrofotômetro. Faz-se necessário utilizar uma curva de calibração desenvolvida com sulfato ferroso ($200 - 2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$), e os resultados são expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra (RUFINO et al., 2006).

3.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Existem inúmeras metodologias disponíveis para avaliar alterações nos lipídeos, entretanto nenhum método padrão é capaz de avaliar todas as alterações oxidativas. Por isso é importante uma combinação de métodos para avaliar os produtos primários e secundários provenientes das reações oxidativas (ARRUDA et al., 2006).

O teste de estufa ou *Schaal Oven Test* é utilizado para acelerar a oxidação, e por meio disso, monitorar por um tempo determinado as alterações ocorridas na amostra. É utilizada uma estufa com circulação de ar a temperatura de

aproximadamente 65 °C, e alguns autores reportam que um dia sob tal armazenamento é correspondente a cerca de um mês de armazenamento a temperatura ambiente (CHONG et al., 2015; YIM et al., 2013).

O índice de acidez fornece informações importantes sobre o estado de conservação de óleos e gorduras. Pois no processo de oxidação, onde a decomposição dos glicerídeos é acelerada por luz ou aquecimento, ocorre a formação de ácidos graxos livres. E por definição, o índice de acidez é o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama de óleo. Sendo, portanto, um parâmetro comum nas especificações de óleos e gorduras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

A absorvidade na região do ultravioleta fornece informações sobre a qualidade, estado de conservação e processamento de óleos e gorduras. A oxidação dos ácidos linoleico e linolênico leva a formação de hidroperóxidos, acompanhada por alterações nas posições de duplas ligações, com formação de compostos conjugados, aumentando assim a absorção na faixa do ultravioleta. Os dienos conjugados resultantes apresentam intensa absorção em 232nm e os trienos em 270nm (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O teste Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) fornece informações importantes a respeito do estado oxidativo de óleos, gorduras e produtos que as contém, por isso, é muito utilizado no controle de qualidade dos mesmos. A análise quantifica um dos principais produtos de decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados formados durante o processo oxidativo, o malonaldeído. A reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído (Figura 9), produz um composto de coloração vermelha (cromogênio) que pode ser medido espectrofotometricamente a 532nm (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

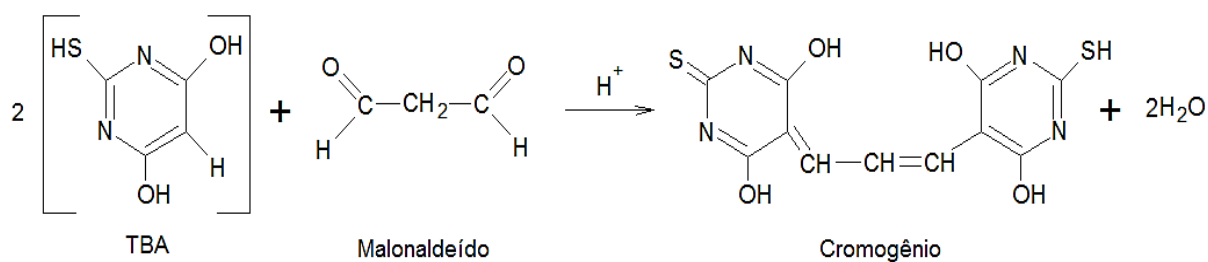


Figura 9 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído, produzindo um composto de coloração vermelha (cromogênio) medido a 532 nm.
Fonte: Adaptado OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES (2005).

A quantificação do malonaldeído presente nas amostras é realizado por meio de curva padrão utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), que em condições ácidas sofrem hidrólise liberando malonaldeído (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

Além dos métodos analíticos disponíveis, os métodos sensoriais são considerados aptos para avaliar a qualidade de óleos e gorduras, embora sejam demorados (NOGALA-KALUCKA et al., 2005).

3.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A busca por novos agentes antibacterianos e antimicrobianos se faz necessário devido ao surgimento de microrganismos mais resistentes. Essa resistência é resultado do elevado consumo de antibióticos pela população. Em vista desse cenário, buscam-se compostos de fontes naturais com propriedades antibacterianas e antimicrobianas, porém com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência dos microrganismos e com menor impacto ambiental (BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008).

A atividade antibacteriana é avaliada por meio de pequenas quantidades da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo utilizado.

Os métodos mais conhecidos para determinar a atividade antibacteriana são método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição. Dentre estes, o método de microdiluição destaca-se por se tratar de uma metodologia barata, com alta reprodutibilidade, sensibilidade e requer pequena quantidade de amostra, o que

possibilita maior número de repetições, aumentando assim a confiabilidade do método (OSTROSKY et al., 2008).

A microdiluição utiliza microplacas de 96 poços, com aproximadamente 0,2 mL do meio de cultura.

Entre os pontos negativos desta técnica está a diferença de comportamento de cada microrganismo, onde alguns aderem as paredes dos poços, e outros ficam em suspensão, dificultando a visualização, e, além disso, quando a amostra teste são extratos de plantas, a forte coloração verde da clorofila também pode interferir na análise (BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas referentes ao desenvolvimento dessa pesquisa estão resumidas no fluxograma abaixo (Figura 10).

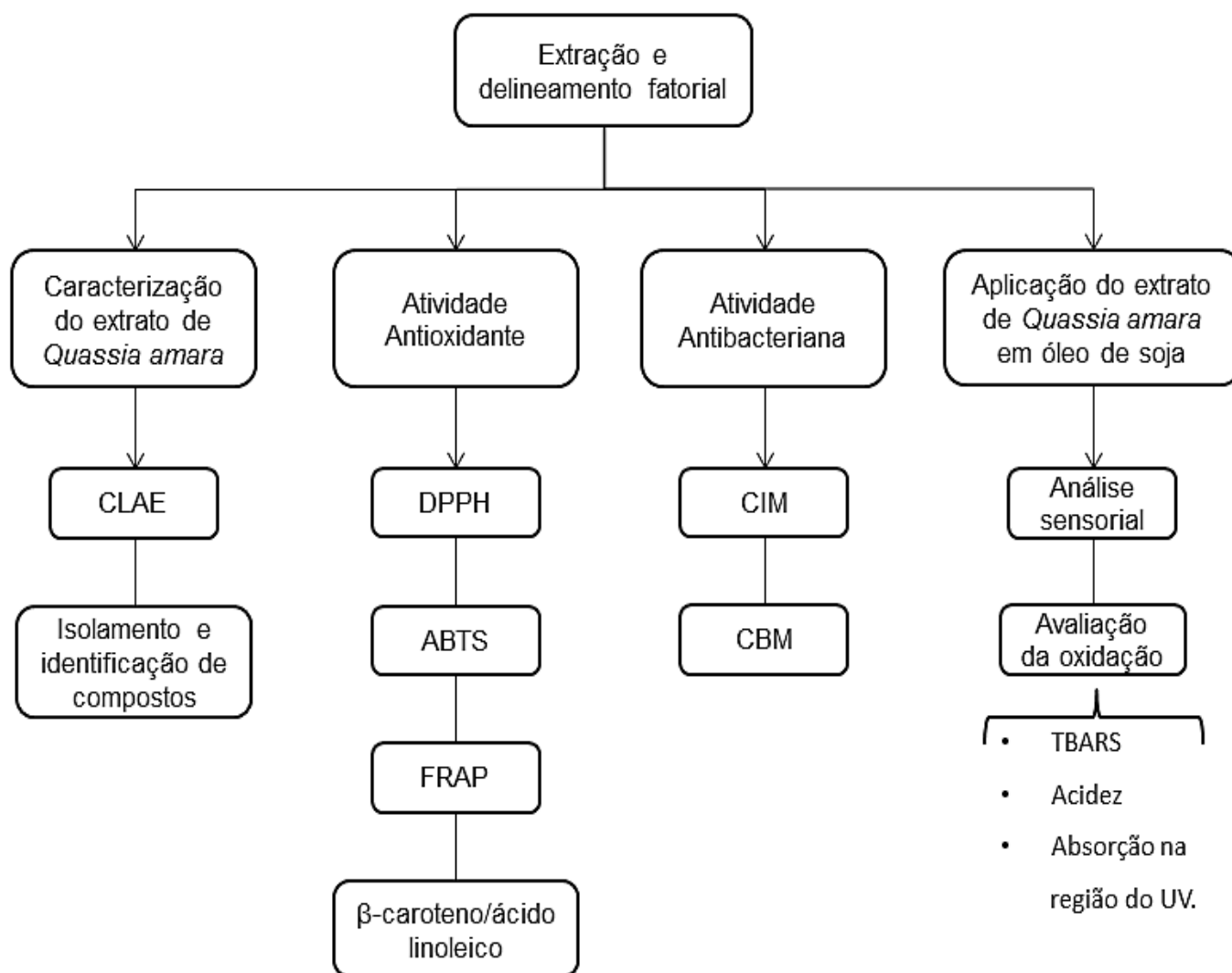


Figura 10 - Fluxograma das atividades desenvolvidas.

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E PREPARO DA AMOSTRA

O material vegetal foi cedido pela Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará e possui voucher incorporado ao herbário João Murça Pires – MG, sob o registro MG 159110. As folhas da amostra bruta de *Quassia amara* foram selecionadas, secas em estufa a 40 °C e trituradas em moinho de facas de bancada (Marconi modelo MA – 630, Pato Branco).

4.2 EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO FATORIAL

Um delineamento fatorial 2³ foi empregado para otimizar o processo de extração de compostos com atividade antioxidante presentes nas folhas de *Quassia amara*, verificando os efeitos das variáveis independentes solvente (etanol e metanol), tempo (30 e 60 minutos), e temperatura (35 e 70 °C) (Tabela 2), sobre as variáveis dependentes teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

Tabela 2 - Condições e variáveis utilizados na otimização da extração de compostos com atividade antioxidante de *Quassia amara*.

	Variável	(-1)	(+1)
X1	Solvente	Metanol	Etanol
X2	Tempo (min.)	30	60
X3	Temperatura (°C)	35	70

O teor de compostos fenólicos totais foi mensurado por meio do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante através do método do sequestro do radical DPPH expresso em mg de Trolox.g⁻¹ de amostra.

A extração dos compostos foi realizada conforme PRADO (2009), com algumas modificações. As folhas moídas (3 g), foram extraídas com 30 mL de solvente e submetidos a agitação em *Shaker* (SL 222), à 120 rpm, segundo o delineamento exposto na Tabela 3. Em seguida, os extratos foram transferidos para

tubo *Falcon* e centrifugados a 500 rpm (*Hermle Z 200 A*), durante 15 minutos, filtrados em papel de filtro e armazenados em frascos hermeticamente fechados, sob abrigo de luz e em freezer a -15 °C para posteriores análises. Cada extração foi realizada em triplicata, totalizando 24 ensaios.

Tabela 3 - Planejamento fatorial para otimização da extração de compostos com atividade antioxidante de *Quassia amara*.

PLANTA	EXTRATOS	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
		X1	X2	X3	Solvente	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
<i>Quassia amara</i>	A1	-1	-1	-1	Metanol	30	35
	A2	-1	-1	-1	Metanol	30	35
	A3	-1	-1	-1	Metanol	30	35
	B1	+1	-1	-1	Etanol	30	35
	B2	+1	-1	-1	Etanol	30	35
	B3	+1	-1	-1	Etanol	30	35
	C1	-1	+1	-1	Metanol	60	35
	C2	-1	+1	-1	Metanol	60	35
	C3	-1	+1	-1	Metanol	60	35
	D1	+1	+1	-1	Etanol	60	35
	D2	+1	+1	-1	Etanol	60	35
	D3	+1	+1	-1	Etanol	60	35
	E1	-1	-1	+1	Metanol	30	70
	E2	-1	-1	+1	Metanol	30	70
	E3	-1	-1	+1	Metanol	30	70
	F1	+1	-1	+1	Etanol	30	70
	F2	+1	-1	+1	Etanol	30	70
	F3	+1	-1	+1	Etanol	30	70
	G1	-1	+1	+1	Metanol	60	70
	G2	-1	+1	+1	Metanol	60	70
	G3	-1	+1	+1	Metanol	60	70
	H1	+1	+1	+1	Etanol	60	70
	H2	+1	+1	+1	Etanol	60	70
	H3	+1	+1	+1	Etanol	60	70

4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999). Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi transferida para tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%). Após 5 minutos de repouso da mistura, foram adicionados 2,0 mL de uma solução de Na_2CO_3 (4%). As soluções foram conservadas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente e após 2 horas foram realizadas a leitura da absorbância à 740nm. Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico, e os resultados foram expressos em mg equivalente em ácido gálico por grama de amostra (mg GAE.g^{-1}) e calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada por quatro métodos distintos descritos a seguir.

4.4.1 Atividade de sequestro do radical DPPH[•]

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH[•] foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). Para avaliação da atividade antioxidante, as amostras reagem com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. A mistura de reação é constituída da adição de 0,5 mL das amostras, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH (0,3 mmol.L^{-1}) em etanol. Mede-se a redução do radical DPPH[•] por meio de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância, em espectrofotômetro à 517 nm, em tempo inicial e à cada 20 minutos até valores estáveis de absorção. Construiu-se a curva padrão de Trolox nas seguintes concentrações 0,0075, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,0625 μmol de trolox. O procedimento para análise seguiu o mesmo

citado para as amostras. Os resultados foram expressos em μmol de Trolox. g^{-1} de amostra.

4.4.2 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do sistema β -caroteno e ácido linoleico, de acordo com metodologia descrita por Ahn et al. (2004). Foram pesados 10 mg de β -caroteno e dissolvido em 100 mL de clorofórmio. Após isto, retirou-se uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio – β -caroteno e adicionou-se 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio. O resíduo obtido foi então redissolvido em 100 mL de água aerada (aerada por 30 minutos). Alíquotas de 3 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 300 μL de cada amostra analisada. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas com incubação à 50 °C, para a reação de oxidação. A amostra controle foi conduzida com 300 μL de etanol 80% e 3 mL da emulsão. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, utilizando a Equação (1):

$$AA(\%) = \frac{DRc - DRs}{DRc \times 100} \quad Eq. (1)$$

Onde:

DRc: taxa de degradação da amostra controle ($\ln(a/b)/120$);

DRs: taxa de degradação da amostra contendo a substância teste ($\ln(a/b)/120$);

a: absorbância inicial no tempo 0 minuto;

b: absorbância depois de 120 minutos.

4.4.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A capacidade de sequestrar o radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico (ABTS^{•+}) foi determinada segundo o método descrito por Re et al. (1999). O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS^{•+} (7 mmol.L⁻¹) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mmol.L⁻¹) e esta solução mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, a solução foi diluída em etanol até obter um comprimento de onda de 700 a 734 nm. As amostras foram adicionadas a solução do ABTS^{•+} e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 minutos de reação. Como referência utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um antioxidante sintético equivalente à vitamina E, nas concentrações de 0,045 à 0,0015 µmol para a curva padrão. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol TEAC.g⁻¹ de amostra (TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.4.4 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) utilizou-se a metodologia descrita por Kukic et al. (2008). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mmol.L⁻¹, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mmol.L⁻¹ TPTZ em 40 mmol.L⁻¹ HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mmol.L⁻¹) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL das amostras foram adicionadas a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37 °C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi desenvolvida com sulfato ferroso (200 a 2000 µmol.L⁻¹), e os resultados expressos em µmol Fe²⁺.g⁻¹ de amostra.

4.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por dois métodos descritos a seguir.

4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Método realizado por microdiluição em placa de 96 poços de acordo com o que está descrito em CLSI, 2005. Os microrganismos utilizados para a determinação da atividade antibacteriana foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella Bongori* ATCC 43975. Essas bactérias foram preparadas a partir de colônias com 24 horas de incubação em meio BHI (*Brain heart infusion*).

Após a preparação das bactérias, as mesmas foram ressuspensas em tubos de ensaios contendo soro fisiológico esterilizado e ajustado para o valor de absorvância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro o que equivale a $1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (UFC: Unidade formadora de colônias), na escala de *Mc Farland*. Com a concentração já ajustada, um volume de 50 µL das suspensões bacterianas foram inoculadas em 50 mL de caldo BHI devidamente esterilizado.

Foram pipetados 190 µL de caldo BHI inoculado nas placas de 96 poços, e em seguida adicionado 10 µL do extrato, com diversas concentrações, e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Para confirmação dos testes, o caldo BHI inoculado foi adicionado na placa juntamente com metanol p.a. e o antibiótico cloranfenicol 0,12% m/v.

Após 24 horas de incubação, foram adicionados 30 µL do corante resazurina (0,01% m/v).

4.5.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Realizada com base nos resultados obtidos no teste da CIM, onde uma alíquota de 10 µL provenientes dos poços, onde não houve crescimento bacteriano, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI e logo

após, foram levadas a estufa por 24 horas a 37 °C (CLSI, 2005). Após o período de incubação, foram verificados se as concentrações testadas conseguiram inibir o crescimento dos microrganismos nas placas de Petri.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO CLAE

Os compostos fenólicos foram identificados a partir da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a injeção foram realizadas novas solubilizações do extrato liofilizado utilizando como solvente metanol de grau espectroscópico e água ultrapura. Em seguida, o extrato foi filtrado com filtro 0,45 µm (Millipore) e injetado um volume de 10 µL em um Cromatógrafo acoplado a um detector de fluorescência com λ em 280 nm, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos para a identificação dos compostos. Utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Varian, mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol (solvente B) e água (solvente A), ambos acidificados com ácido acético a 0,1%, com eluição em modo gradiente. O gradiente iniciou com 5% de B até 7% de B em 7 minutos, 20% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 90% de B em 50 minutos e 95% de B em 55 minutos, mantendo esta concentração por mais 10 minutos, numa vazão de 1 mL por minuto (OLDONI et al., 2015). Foram examinados os seguintes padrões autênticos: ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, epicatequina, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido salicílico, miricetina, resveratrol e quercetina. Foi utilizado o Cromatógrafo (Varian Inc. Walnut Creek, C.A US) pertencente a Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Pato Branco.

4.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

Visando o isolamento de substâncias presentes no extrato de *Quassia amara* foram utilizadas técnicas de fracionamento por partição em série, purificação por Cromatografia em Coluna (CC) com sílica gel e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

As análises espectroscópicas de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas no Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (DQ-FFCLRP-USP) com a supervisão do professor Dr.º Gil Valdo José da Silva. Para a identificação dos compostos utilizou-se RMN ^1H e RMN ^{13}C , e os bidimensionais COSY (*Correlation Spectroscopy* – Espectroscopia de Correlação), DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* – Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence* - Coerência Heteronuclear através de Múltiplas Ligações) e HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* – Correlação Heteronuclear Múltiplo-Quântica). Os espectros foram obtidos em espectrômetro Advance-400 (Bruker), operando a 500,13 MHz para ^1H e 125,75 e 500,13 MHz para ^{13}C . Para a realização das análises, as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (99,8%) (Aldrich) e como padrão de referência utilizou-se tetrametilsilano (TMS) ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm).

4.8 APLICAÇÃO DO EXTRATO EM ÓLEO DE SOJA REFINADO

O óleo de soja refinado, isento de antioxidantes sintéticos, foi gentilmente cedido por uma empresa paranaense, e armazenado sob congelamento ($-15\text{ }^\circ\text{C}$) até o momento de uso.

O extrato metanólico de *Quassia amara* foi liofilizado, até total eliminação do solvente, e rediluído em etanol para posterior aplicação no óleo de soja e avaliação dos efeitos na inibição da oxidação lipídica.

4.8.1 Testes de oxidação

A avaliação da oxidação do óleo de soja foi realizada por meio dos métodos expostos a seguir.

4.8.1.1 Teste acelerado de estufa ou *Schaal Oven Test*

O teste acelerado de estufa foi realizado de acordo com Chong et al. (2015), com algumas modificações. Utilizou-se quatro tratamentos: óleo de soja refinado isento de antioxidantes (controle), adicionado com antioxidante sintético TBHQ (200 ppm, limite permitido pela legislação vigente (ANVISA, 2005)), e adicionado com extrato de *Quassia amara* (100 e 200 ppm). Os resultados da análise de fenólicos totais foram utilizados para os cálculos das concentrações (mg.kg^{-1}).

Foram mantidos em estufa com circulação de ar a 65 ± 2 °C (CHONG et al., 2015; MEI et al., 2014; YIM et al., 2013) durante 96 horas (IQBAL; BHANGER, 2007) e avaliados nos tempos 0, 48 e 96 horas por meio de índice de acidez, absorvidade na faixa do ultravioleta (UV) e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

4.8.1.2 Índice de acidez (IA)

O IA foi determinado de acordo com a metodologia Ca 5-40 (AOCS, 2003). E os resultados expressos em mg de KOH.g^{-1} por meio da Equação (2):

$$IA = \frac{V * 56,11 * f}{m} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

V: volume gasto de solução padronizada de hidróxido de sódio (mL);

f: fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

m: massa da amostra (gramas).

4.8.1.3 Determinação da extinção específica por absorção na região ultravioleta (UV)

A absorvidade na faixa do ultravioleta foi determinada segundo metodologia Ch 5-91(AOCS, 2003). Os resultados calculados por meio da Equação (3):

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{Abs}{C} \quad Eq. (3)$$

Onde:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$: Extinções específicas (absorbância de uma solução a 1% do óleo no solvente ciclohexano, numa espessura de 1 cm);

Abs: Absorbância no comprimento de onda;

C: Concentração da solução de amostra (g.100 mL⁻¹).

4.8.1.4 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

As Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) resultantes da oxidação lipídica foram determinadas pelo método de extração em ácido tricloroacético (TCA), segundo Yim et al. (2013), com modificações.

Foram homogeneizados 5g de óleo com 50 mL de TCA 15% em solução com galato de propila e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Após o processo de homogeneização, a mistura foi filtrada e alíquotas transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de TCA (15%) e 5 mL TBA (ácido tiobarbitúrico) (0,02 mol.L⁻¹), os quais foram agitados e mantidos sob aquecimento à 95 °C durante 40 minutos.

Após o resfriamento com gelo, foram feitas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 538 nm.

Uma curva padrão de malonaldeído (MDA) foi preparada usando 1,1,3,3 - tetrametoxipropano (TEP) onde os valores de TBARS foram expressos em mg de MDA por kg de amostra.

4.8.2 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada em cabines individuais no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco.

Utilizou-se os quatro tratamentos: óleo de soja refinado isento de antioxidantes (controle), adicionado com antioxidante sintético TBHQ (200 ppm,

limite permitido pela legislação vigente (ANVISA, 2005)), e adicionado com extrato de *Quassia amara* (100 e 200 ppm).

Os tratamentos foram avaliados quanto ao sabor ranço, por meio de teste discriminativo com escala hedônica não estruturada de 10 cm, apresentada com os números 0 e 10 nos extremos (HOUGH; FISZMAN, 2005), por sete julgadores treinados para avaliação do sabor ranço.

As amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar a 65 ± 2 °C (CHONG et al., 2015; MEI et al., 2014; YIM et al., 2013) e avaliadas durante 96 horas (IQBAL; BHANGER, 2007) com intervalos regulares de 0, 48 e 96 horas.

Para apresentação aos julgadores treinados, 15 mL das amostras (BORRÀS et al., 2015) a 50 °C (HOUGH; FISZMAN, 2005), foram colocadas em copos pretos, para que a cor não interferisse no julgamento, e codificadas com três dígitos aleatórios. Juntamente com as amostras foram servidos os padrões mínimo (óleo não rancificado) e máximo (14 dias em estufa com circulação de ar a 60 °C (HOUGH; FISZMAN, 2005)) do sabor ranço, água mantida a 40 °C (HOUGH; FISZMAN, 2005) e bolachas. A análise foi realizada em triplicata durante cada dia.

Também se utilizou teste discriminativo de ordenação para verificar o gosto amargo entre as amostras apresentadas (Figura 11).

	Universidade Tecnológica Federal do Paraná Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos			
Nome: _____ data: _____				
Das amostras dadas, coloque-as na escala abaixo segundo a intensidade do sabor de ranço, considerando os padrões de mínimo e máximo dados:				
Amostras	0	10		
_____	-----	-----		
_____	-----	-----		
_____	-----	-----		
_____	-----	-----		
Ordene as amostras em ordem crescente quanto ao gosto amargo.				
_____	_____	_____	_____	_____
- amargo				+ amargo

Figura 11 - Modelo de ficha utilizado na Análise Sensorial (teste discriminativo com escala não estruturada de 10 cm e teste de ordenação).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os dados avaliados por meio de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$), utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, USA).

5 RESULTADOS

5.1 DELINEAMENTO FATORIAL

A busca pela otimização de processos, minimizando custos e tempo, e maximizando rendimento e produtividade, tem levado pesquisadores a optarem por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. A metodologia de planejamento fatorial, em conjunto com as superfícies de respostas, fundamentados na teoria estatística, proporcionam informações seguras sobre o processo otimizado, minimizando erros que envolvem o hábito de técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

No presente estudo, utilizou-se o delineamento fatorial com o objetivo de otimizar o processo de extração de compostos com atividade antioxidante presente nas folhas de *Quassia amara*.

As variáveis dependentes adotadas foram a quantificação do teor de compostos fenólicos totais, e a atividade antioxidante por meio do método de captura do radical DPPH.

O teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos de folhas de *Quassia amara* submetidos aos tratamentos (A ao H), de acordo com o delineamento fatorial (Item 4.2), estão sumarizados na Tabela 4.

O teor de compostos fenólicos totais variou de $58,66 \pm 3,61$ a $209,39 \pm 1,87$ mg EAG.g⁻¹ (Tabela 4).

O teor mais elevado de compostos fenólicos foi obtido no ensaio G ($209,39 \pm 1,87$ mg EAG.g⁻¹), no qual foi utilizado o metanol como solvente a 70 °C durante 60 minutos de extração (Tabela 4), diferindo estatisticamente dos demais ensaios. Enquanto que o menor teor foi observado no ensaio B e não diferindo estatisticamente do ensaio D. Estes ensaios foram realizados com etanol na temperatura de 35 °C com tempos de 30 e 60 minutos, respectivamente (Tabela 4).

A atividade antioxidante dos extratos variou de $505,67 \pm 23,53$ a $1898,02 \pm 8,60$ μmol de trolox.g⁻¹. A maior atividade antioxidante foi encontrada no ensaio G, que diferiu estatisticamente dos demais ensaios.

Tabela 4 - Resultados referentes ao delineamento fatorial para compostos fenólicos e DPPH determinados em *Quassia amara*

Ensaio	Variáveis reais			<i>Quassia amara</i>	
	Solvente	tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Fenólicos totais (mg EAG [*] .g ⁻¹)	DPPH (μmol de trolox.g ⁻¹)
A	Metanol	30	35	177,26 ^c ± 4,76	899,58 ^e ± 21,03
B	Etanol	30	35	58,66 ^f ± 3,61	505,67 ^g ± 23,53
C	Metanol	60	35	196,95 ^b ± 2,74	1614,88 ^b ± 26,16
D	Etanol	60	35	64,88 ^f ± 1,92	662,14 ^f ± 21,50
E	Metanol	30	70	200,76 ^b ± 1,74	1334,22 ^c ± 10,22
F	Etanol	30	70	119,93 ^e ± 0,97	1035,93 ^d ± 32,12
G	Metanol	60	70	209,39 ^a ± 1,87	1898,02 ^a ± 8,60
H	Etanol	60	70	148,69 ^d ± 2,98	1490,45 ^b ± 19,11

Médias ± desvio padrão; *EAG: Equivalente em ácido gálico; Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Neste estudo, foi possível observar que os extratos que apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais, também apresentaram maior atividade antioxidante. Essa correlação positiva também foi observada por Ballesteros et al. 2017, na otimização da extração de compostos com atividade antioxidante em grãos de café, por Belwal et al. 2016 em extratos de berberis asiatica visando otimizar a extração de compostos fenólicos, e por Vizzotto; Pereira (2011) na otimização da extração de compostos fenólicos em amora-preta.

A escolha das variáveis reais é de fundamental importância para se obter bons resultados no delineamento, e tal tarefa depende da experiência e da busca por materiais já existentes na literatura.

Vários sistemas de solventes vêm sendo empregados para a extração de polifenóis em matérias vegetais visando analisar a atividade antioxidante (ROCKENBACH et al., 2008). Dentre os mais utilizados estão os solventes metanol,

etanol, água, acetona, acetato de etila e combinações entre eles (NACZK; SHAHIDI, 2004). E por alcançar a extração de elevados teores de compostos bioativos em diferentes matrizes, o solvente metanol tem sido apontado como o mais efetivo (OLIVEIRA et al., 2014).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que os compostos presentes nas folhas de *Quassia amara* com atividade antioxidante, são mais facilmente extraídos quando utilizados solventes mais polares, como o metanol (Tabela 4).

Outro fator importante na extração de compostos com atividade antioxidante é o tempo, pois longos períodos de extração podem aumentar a possibilidade de oxidação dos fenólicos presentes. Segundo Andreo; Jorge (2006), o tempo deve variar de um minuto a vinte e quatro horas de extração.

No presente trabalho, os maiores valores de fenólicos totais e atividade antioxidante foram obtidos com tempo de 60 minutos, demonstrando que, dentre os tempos testados, este mostrou-se mais eficiente para a extração de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Quassia amara*.

A temperatura de extração é um fator determinante na quantificação de compostos com atividade antioxidante presente em extratos, pois podem promover a volatilização e decomposição térmica dos compostos, sendo esta última a maior responsável pela redução do teor de polifenóis (ANDREO; JORGE, 2006).

De acordo com os resultados obtidos com o delineamento fatorial, para ambas as análises utilizadas, pode-se observar que os maiores teores foram obtidos com a temperatura de 70 °C, corroborando com a influência direta da temperatura na quantificação de compostos com atividade antioxidante (Tabela 4).

Por fim, conclui-se que, além dos benefícios já apresentados do delineamento fatorial, também possibilita conhecer mais sobre os compostos presentes em sua matriz, e encontrar as condições ótimas para sua extração.

5.1.1 Análise de variância (ANOVA) Superfície de resposta

O método de superfície de resposta foi realizado por meio de delineamento fatorial 2³, utilizando três fatores distintos (solvente, tempo e temperatura) para otimizar a extração de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Quassia*

amara. Os efeitos de cada variável independente (fatores) foram analisados pelo teste *t* e por análise de variância (ANOVA). Os resultados da ANOVA utilizados para validação estatística e verificação do modelo gerado estão apresentados na Tabela 5 e 6.

Os resultados significativos podem ser observados a partir do *p*-valor, onde todos os valores menores que 0,05 (nível de confiança de 95%) são significativos. O *p*-valor é a probabilidade de se observar um valor da estatística de teste maior ou igual ao encontrado (FERREIRA; PATINO, 2015). É utilizado para avaliar a significância dos coeficientes, de modo que, quanto menor, maior a significância do coeficiente de variação.

Pela análise de variância (ANOVA), os três fatores independentes analisados (solvente, tempo e temperatura) foram significativos para as variáveis dependente fenólicas totais e atividade antioxidante como mostram as Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Analisando os *p*-valores das interações, para o teor de compostos fenólicos totais, somente a interação solvente e tempo apresentaram efeito significativo. Neste caso todos os *p*-valores com efeito significativo foram menores que 0,0001, sendo, portanto, considerados altamente significativos (Tabela 5).

Tabela 5 - ANOVA para a variável dependente Fenólicos Totais em extratos de *Quassia amara*.

Fatores	Variável dependente: Fenólicos totais (mg EAG [*] .g ⁻¹)				
	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	F _{calculado}	p-valor
Solvente (X1)	57680,014	1	57680,014	1782,602	0,0000
Tempo (X2)	1502,659	1	1502,659	46,440	0,0000
Temperatura (X3)	12287,530	1	12287,530	379,746	0,0000
X1;X3	16,667	1	16,667	0,515	0,4826
X1;X2	4467,061	1	4467,061	138,055	0,0000
X2;X3	49,525	1	49,525	1,531	0,2328
Resíduo	550,073	17	32,357		
Total	76553,528	23			

*EAG: Equivalente em ácido gálico; G.L.:Graus de liberdade; Resultados em negrito referem-se a diferenças significativas ($p \leq 0,05$); $F_{1;17;0,5}=4,45$.

Para a atividade antioxidante expressa em $\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$, dentre as interações, somente a interação entre tempo e temperatura não apresentou efeito significativo (Tabela 6). Pode-se observar também o nível de significância apresentadas pelos p -valores, onde, dentre todos considerados significativos, somente a interação entre solvente e tempo não apresentou valor menor que 0,0001 (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para a variável dependente Atividade antioxidante em folhas de *Quassia amara*

Fatores	Variável dependente: Atividade antioxidante ($\mu\text{mol de trolox.g}^{-1}$)				
	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	$F_{\text{calculado}}$	p -valor
Solvente (X1)	1579790,954	1	1579790,954	246,072	0,0000
Tempo (X2)	1339640,656	1	1339640,656	208,666	0,0000
Temperatura (X3)	1616707,900	1	1616707,900	251,822	0,0000
X1;X3	167387,709	1	167387,709	26,073	0,0000
X1;X2	153977,909	1	153977,909	23,984	0,0001
X2;X3	8052,357	1	8052,357	1,254	0,2783
Resíduo	109140,552	17	6420,032		
Total	4974698,037	23			

G.L.:Graus de liberdade; Resultados em negrito referem-se a diferenças significativas ($p \leq 0,05$). $F_{1;17;0,5}=4,45$.

Os efeitos de cada fator podem ser verificados por meio dos gráficos de Pareto, onde os valores absolutos do $t_{\text{calculado}}$ fornecem as alturas das barras, que por sua vez, estão dispostas de modo crescente. O valor de $t_{\text{tabelado}} = t_{(17;5\%)} = 2,11$ complementa o diagrama, fornecendo a partir de qual valor os efeitos são significativos (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Para a análise de fenólicos totais (Figura 12), os fatores independentes (solvente, tempo e temperatura) apresentaram efeito significativo. E, dentre eles, o fator que apresentou maior influência significativa foi o solvente. O efeito negativo indica que dentre os solventes utilizados, o metanol (variável codificada -1), apresentou maior efeito significativo. E, somente a interação entre solvente e temperatura apresentou efeito significativo.

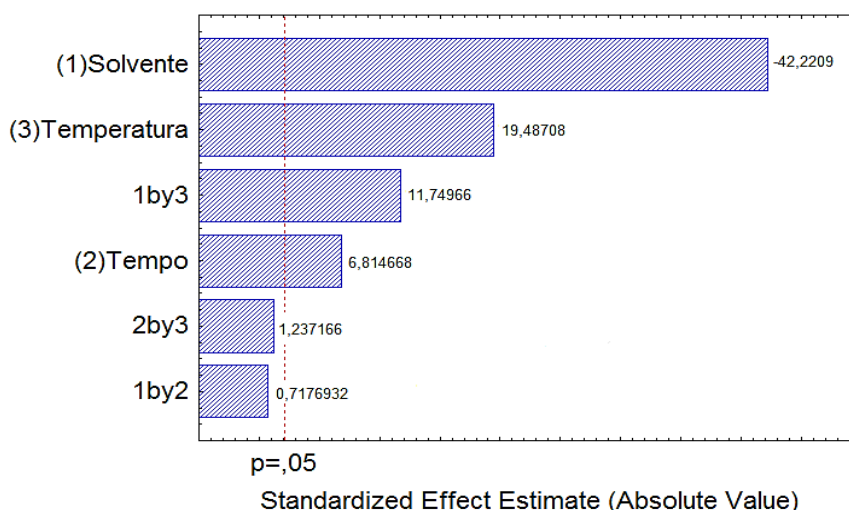


Figura 12 - Gráfico de Pareto para a análise de Fenólicos Totais com a amostra *Quassia amara*.

Para a análise de atividade antioxidante (DPPH) (Figura 13), as variáveis independentes apresentaram efeito significativo, e o fator temperatura foi o que apresentou maior influência significativa. O fator solvente novamente apresentou efeito negativo, demonstrando assim que, igualmente na análise de fenólicos totais, dentre os solventes utilizados, o metanol exerceu maior efeito significativo. Dentre as interações, foi significativa a interação entre solvente e tempo (efeito significativo e negativo) e entre solvente e temperatura (significativo e positivo).

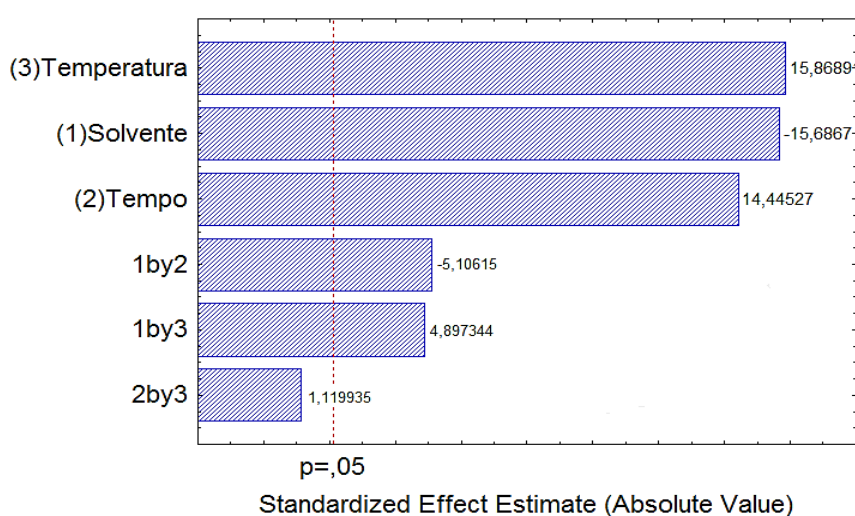


Figura 13 - Gráfico de Pareto para a análise de DPPH com a amostra *Quassia amara*.

Uma das condições exigidas pelo modelo estatístico utilizando ANOVA é que os erros de ajustamento sejam independentes e normalmente distribuídos, condições essas que podem ser observadas abaixo (Figuras 14 e 15).

Para a análise de fenólicos totais (Figura 14), os pontos dispostos não muito distantes da reta normal (valores preditos) evidenciando que as pressuposições do modelo estão satisfeitas.

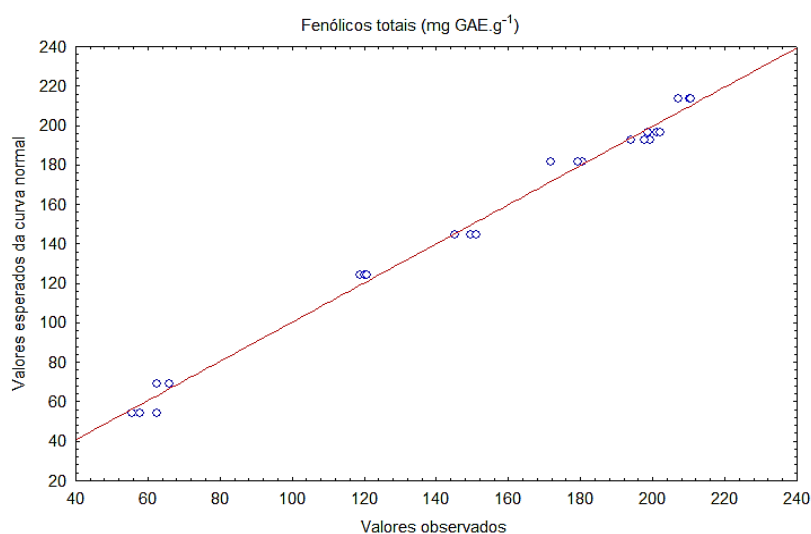


Figura 14 - Distribuição dos resultados obtidos na análise de Fenólicos totais em torno da reta que indica normalidade.

O mesmo comportamento pode ser observado para os resultados obtidos para a atividade antioxidante (DPPH) (Figura 15), demonstrando que as especificações do modelo estão satisfeitas.

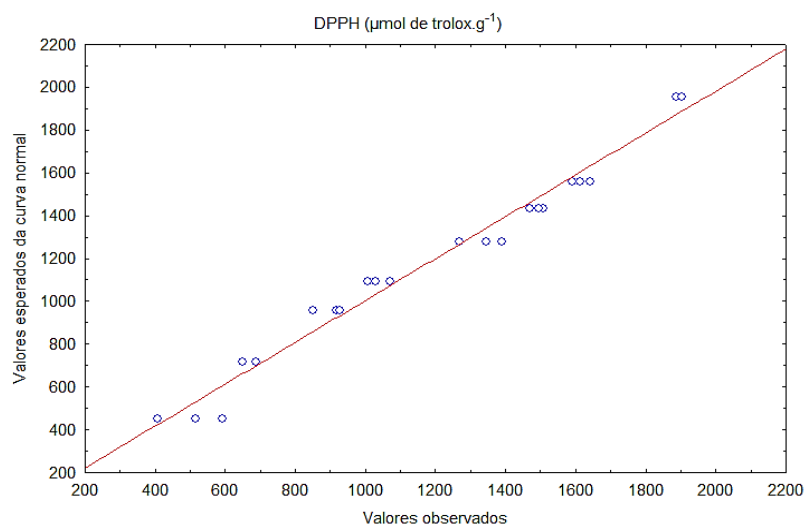


Figura 15 - Distribuição dos resultados obtidos na análise de DPPH em torno da reta que indica normalidade.

Os resultados obtidos foram também analisados por regressão linear múltipla, e por meio desta, foram gerados modelos ajustados levando em consideração somente os efeitos significativos para as variáveis dependentes fenólicos totais e atividade antioxidante (Tabela 7).

Tabela 7 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) em função dos fatores solvente, tempo e temperatura.

Variáveis Dependentes	Modelos gerados por regressão linear múltipla	Equação	Coefficiente de Correlação (R ²)
Fenólicos totais (mg EAG [*] .g ⁻¹)	$147,071 - 49,024x_1 + 7,913x_2 + 22,627x_3 + 13,643x_1x_3$	4	0,992
DPPH (μmol de trolox.g ⁻¹)	$1180,116 - 256,563x_1 + 236,259x_2 + 259,544x_3 - 83,513x_1x_2 + 80,098x_1x_3$	5	0,970

*EAG: Equivalente em ácido gálico; x₁: solvente; x₂: tempo; x₃: temperatura.

Para cada um dos modelos gerados, pode-se notar que a porcentagem de variação explicada (R²) foi superior a 0,95, concluindo assim que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Por meio dos modelos geraram-se superfícies de respostas (Figuras 16 a 21), onde as variáveis dependentes (fenólicos totais e atividade antioxidante) estão em função das variáveis reais (solvente, tempo e temperatura).

Analisando os gráficos de superfície gerados a partir dos resultados da variável dependente fenólicos totais e relacionando os fatores temperatura e solvente (Figura 16) atenta-se que os melhores resultados foram obtidos nas condições de 70 °C e utilizando o solvente metanol, demonstrando considerável robustez.

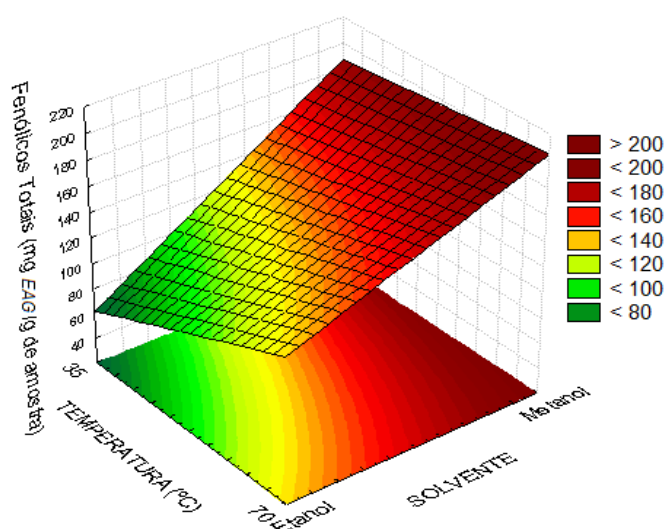


Figura 16 - Gráfico de superfície referente a compostos fenólicos em função as variáveis temperatura (°C) e solvente.

Quando analisados a relação entre tempo e solvente (Figura 17), os melhores resultados foram atingidos ao decorrer da extração com o solvente metanol, entretanto a condição ótima foi atingida com o tempo de 60 minutos e o solvente metanol.

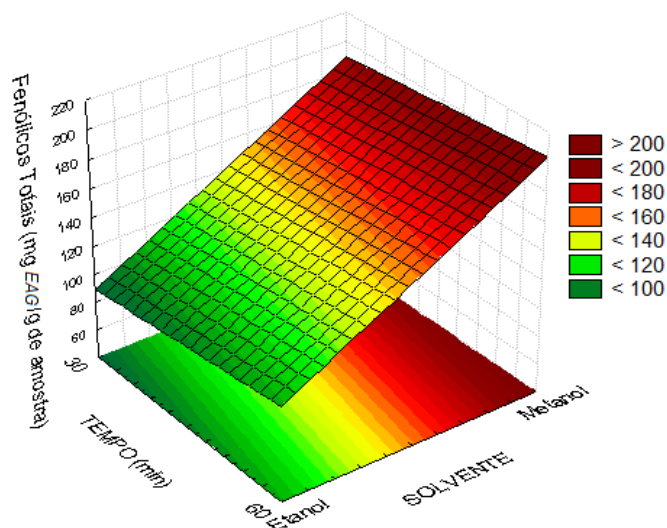


Figura 17 - Gráfico de superfície referente a compostos fenólicos em função as variáveis tempo (minutos) e solvente.

Por fim, relacionando os fatores tempo e temperatura (Figura 18) a condição ótima foi atingida com a maior temperatura (70 °C) e o maior tempo (60 minutos).

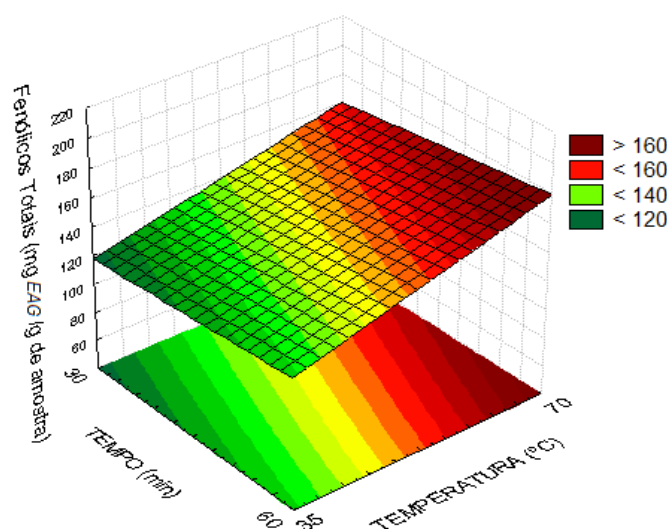


Figura 18 - Gráfico de superfície referente a compostos fenólicos em função as variáveis tempo (minutos) e temperatura (°C).

Para a extração de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Quassia amara* mensurados pela análise de DPPH e relacionando temperatura e solvente (Figura 19), percebe-se que com a maior temperatura (70°C) e o solvente metanol foram obtidos os resultados superiores.

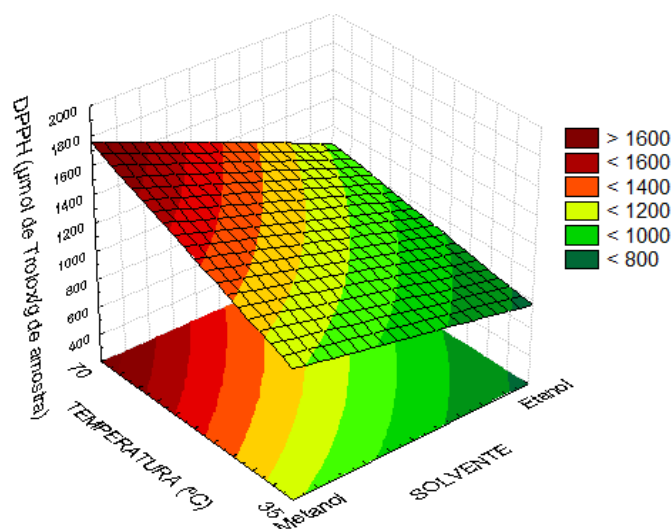


Figura 19 - Gráfico de superfície referente a atividade antioxidante em função as variáveis temperatura (°C) e solvente.

Quando relacionados no gráfico de superfície os fatores tempo e solvente (Figura 20) para essa variável (atividade antioxidante), os melhores resultados foram obtidos com tempo de 60 minutos e o solvente metanol, mostrando maior robustez, pois consegue manter sua condição ótima.

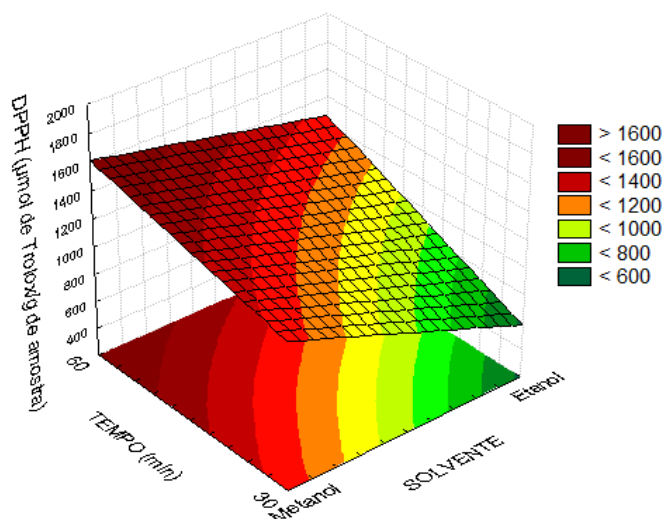


Figura 20 - Gráfico de superfície referente a atividade antioxidante em função as variáveis tempo (minutos) e solvente.

Já quando relacionado os fatores tempo e temperatura (Figura 21), nota-se que as condições ótimas foram atingidas com o tempo superior de 60 minutos e a temperatura de 70 °C, embora não apresente muita robustez.

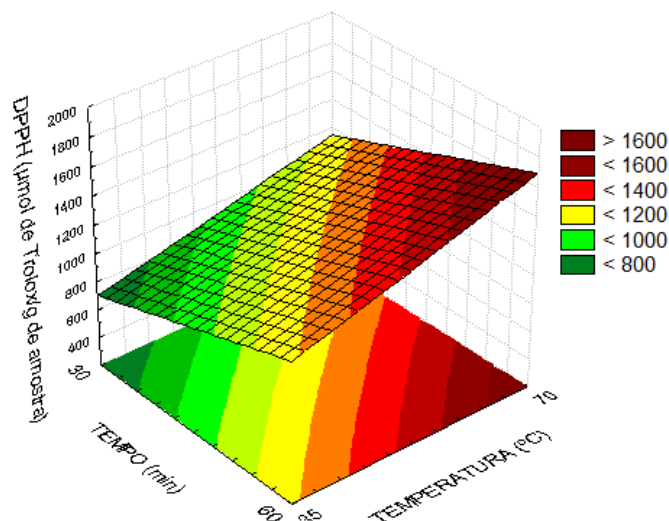


Figura 21 - Gráfico de superfície referente a atividade antioxidante em função as variáveis tempo (minutos) e temperatura (°C).

O delineamento fatorial é uma forma de apresentar a pesquisa em âmbito geral e a otimização permite verificar e conhecer a amostra em questão, permitindo a redução do número de ensaios sem prejuízo na qualidade da informação.

De acordo com os resultados, conclui-se que a melhor condição de extração de compostos com atividade antioxidante presentes nas folhas de *Quassia amara*, dentre as condições testadas, foi utilizando o solvente metanol, com temperatura de 70 °C durante 60 minutos. Tendo o extrato metanólico de *Quassia amara* apresentado um notável teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, foi adotado para a continuidade deste trabalho.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Quassia amara*

5.2.1 Identificação de Compostos Fenólicos utilizando CLAE

Os compostos fenólicos estão entre as substâncias mais abundantes presentes nos vegetais. As pesquisas atuais apontam que, dentre seus inúmeros efeitos benéficos à saúde, estão a redução do risco de doenças crônicas, pois tais doenças estão associadas ao estresse oxidativo induzido pelos radicais livres (BOROSKI et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2017; RAMOS, 2016).

Dentre as técnicas existentes para a identificação e quantificação de compostos fenólicos em diversas matrizes, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) destaca-se devido sua boa sensibilidade, reprodutibilidade, separação e pequena quantidade de amostra, sendo por isso, muito utilizado em indústrias farmacêuticas e em diversas áreas de pesquisa (JEVRIC et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2011).

Neste estudo, o uso da CLAE teve como objetivo a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato metanólico de *Quassia amara* (Figura 22), utilizando uma curva dos padrões autênticos ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, catequina, epicatequina, rutina, ácido salicílico, miricitina, quercetina, e resveratrol.

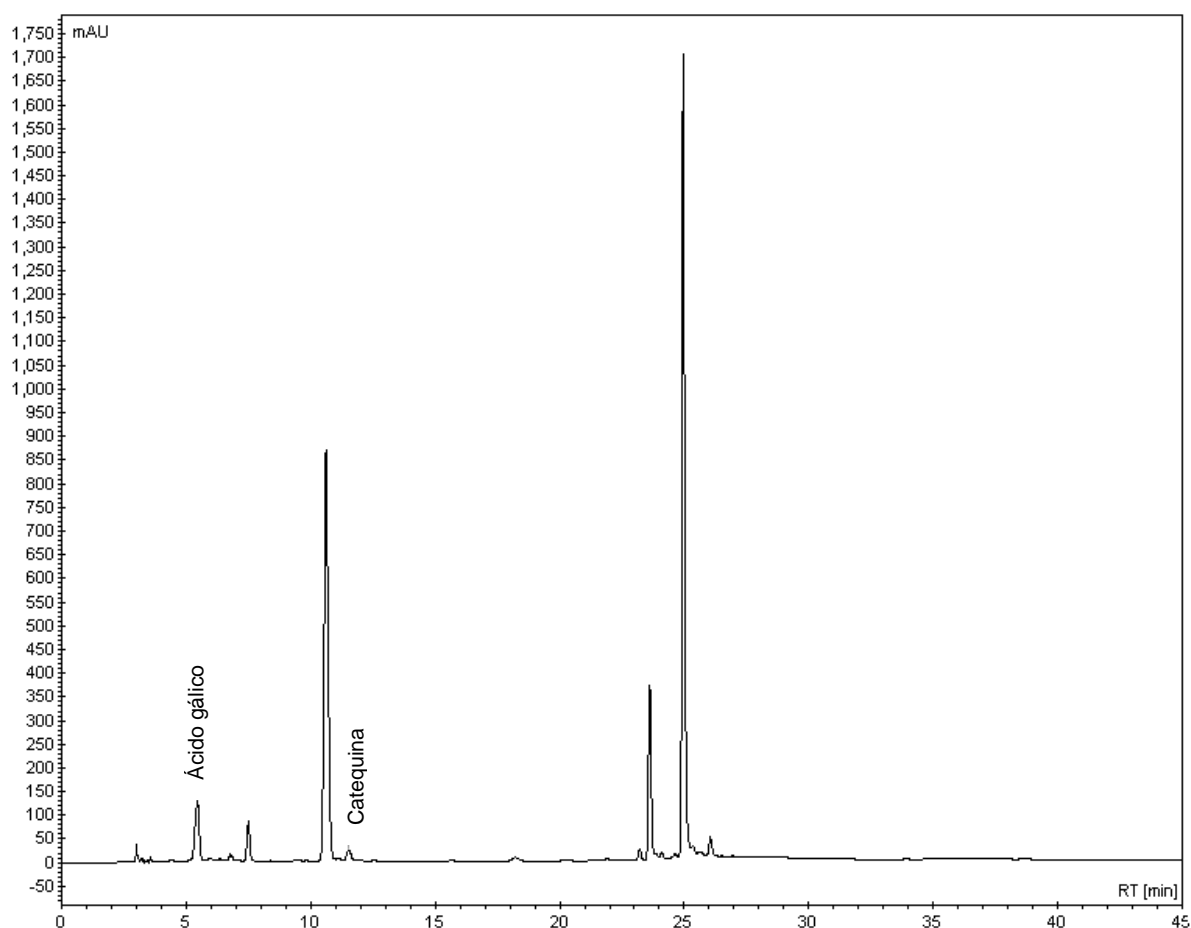


Figura 22- Cromatograma do extrato metanólico de *Quassia amara*.

Foram identificados e quantificados os compostos fenólicos ácido gálico (tempo de retenção: 5,77 minutos; λ : 272 nm) e catequina (tempo de retenção: 11,49 minutos; λ : 280 nm) no extrato metanólico de *Quassia amara*, nas concentrações de 58,12 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 42,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente (Figura 22).

Ferrari (2013) elaborou o extrato hidroalcoólico de *Quassia amara* em banho-maria a 70 °C durante 30 minutos. Neste extrato foram quantificados alguns compostos fenólicos como: rutina (121,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$), miricitina (537,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$), quercetina (28,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$), catequina (30,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$), ácido *p*-cumárico (36,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$), ácido gálico (9,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e ácido transcinâmico (288,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Embora a extração com o solvente metanol tenha conseguido extrair o ácido gálico e a quercetina em maiores concentrações, quando comparado ao estudo de Ferrari (2013), o etanol possibilitou a extração de mais compostos fenólicos. Além das diferenças no processo de extração, essa diferença pode também ser devido as condições utilizadas durante a análise cromatográfica, local de coleta da planta e sazonalidade.

Fabre et al. (2012) também identificaram ácido gálico no extrato etanólico de *Quassia amara* (15 $\mu\text{g.g}^{-1}$). No mesmo estudo foram identificados os compostos metil galato (4,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e vitexina (10 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

O composto ácido gálico já foi identificado tanto em extratos da *Quassia amara* como em algumas plantas do mesmo gênero e família (ALVES et al., 2014; MARANHÃO et al., 2014a, 2014b; MELLO; MELLO; LANGELOH, 2009). A capacidade antioxidante do ácido gálico é atribuída principalmente a sua estrutura (OLIVEIRA et al., 2016), também são atribuídas ao composto, atividades anticancerígena, antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória (LIMA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

Para o composto catequina, além da capacidade antioxidante, são também atribuídos benefícios à saúde como controle da obesidade e prevenção do cancro (ALBUQUERQUE et al., 2016). Este composto já havia sido identificado em extratos de *Quassia amara* e em algumas plantas da mesma família (FERRARI, 2013; MARANHÃO et al., 2014a, 2014b).

Além das atividades apresentadas pelos compostos fenólicos presentes no extrato de *Quassia amara*, as atividades biológicas da planta são atribuídas principalmente ao seu alto teor de quassinoides, dos quais os majoritários são a quassina e neoquassina. A estes quassinoides são atribuídas atividades biológicas como anticâncer, antimalárica, fitotóxica, inseticida, antiviral, antioxidante e anti-

inflamatória (ALMEIDA et al., 2007; GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011), justificando as diversas atividades apresentadas pela *Quassia amara*. Entretanto, somente o isolamento, identificação e análises de suas substâncias podem assegurar se tais atividades advêm de uma substância específica ou do sinergismo entre sua composição.

5.2.2 Isolamento e identificação de substâncias

Para dispormos de quantidade de amostras passíveis de identificação e isolamento, reproduziu-se a melhor condição encontrada na otimização do processo de extração de compostos com atividade antioxidante de *Quassia amara* em maior escala (240 g de planta para 2,4 L de metanol), obtendo-se assim o extrato bruto, sendo este rotaevaporado e liofilizado.

Iniciou-se o estudo fitoquímico da *Quassia amara* a partir do fracionamento do extrato bruto por partição, utilizando 20 g do extrato metanólico liofilizado redissolvido em 50 mL de metanol. Os solventes utilizados, separadamente e na sequência, foram hexano, acetato de etila e metanol. Desta forma, foi obtida a fração hexânica (FHQa), a fração acetato de etila (FACQa) e a fração metanólica (FMQa) (Figura 23).

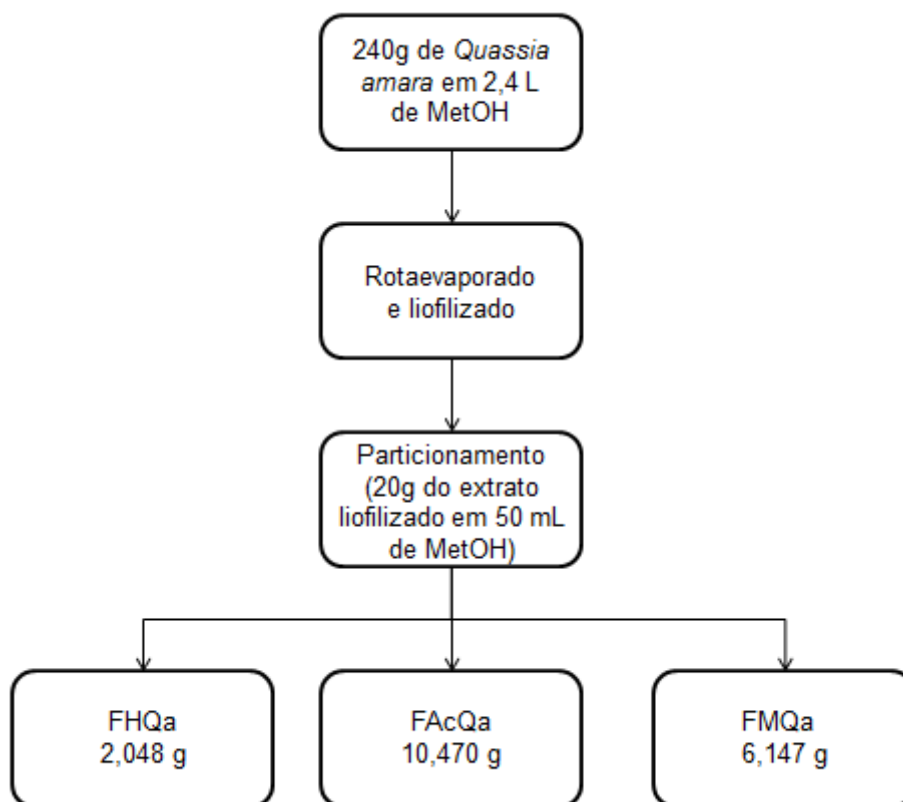


Figura 23 – Fluxograma das atividades desenvolvidas para a obtenção das frações hexânica (FHQa), acetato de etila (FACQa) e metanólica (FMQa).

De acordo com as massas obtidas para cada uma das frações (FHQa, FACQa e FMQa), a etapa de particionamento totalizou 93,32% de eficiência.

As frações FHQa, FACQa e FMQa foram analisadas segundo o teor de compostos fenólicos totais por meio do método de Folin-Ciocalteu, e obteve-se os valores de $86,12 \pm 0,28$ mg EAG.g⁻¹, $635,93 \pm 2,86$ mg EAG.g⁻¹ e $491,33 \pm 2,16$ mg EAG.g⁻¹, respectivamente. De acordo com esses resultados, priorizou-se iniciar a identificação de compostos com a FACQa, tendo em vista a verificação de compostos responsáveis pela atividade antioxidante da fração.

A FACQa foi rotaevaporada e 0,8 g foi purificado em coluna cromatográfica aberta. A sílica da *Sigma-Aldrich* 70-23 mesh (tamanho do poro 60 Å), foi usada como fase estacionária e o seguinte sistema de solventes foi utilizado como fase móvel: hexano (100%); hexano/acetato de etila (9,5: 0,5; 9:1; 8,5:1,5; 8:2; 7,5:2,5; 7:3; 6:4; 4:6 e 3:7); acetato de etila (100%); acetato de etila/diclorometano (9:1; 7:3; 4:6 e 3:7); diclorometano (100%); diclorometano/metanol (9:1; 8:2; 7:3; e 2:8) e metanol (100%), resultando em 103 sub-frações.

As sub-frações eluentes da coluna cromatográfica foram submetidas a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e agrupadas de acordo com a similaridade de seu tempo de retenção. Resultando em 12 novas sub-frações (Tabela 8).

Tabela 8 – Sub-frações obtidas por meio do fracionamento e purificação da FAcQa com coluna cromatográfica.

Sub-frações agrupadas	Nº Sub-fração	Massa (mg)
1-12	Qa 1	85,0
13-37	Qa 2	29,0
38-43	Qa 3	67,7
44-50	Qa 4	6,8
51-52	Qa 5	7,9
53-73	Qa 6	5,8
74-75	Qa 7	4,1
76-80	Qa 8	34,2
81-86	Qa 9	45,4
87-92	Qa 10	187,2
93-95	Qa 11	140,4
96-103	Qa 12	45,7

O total de massas obtidos nas sub-frações da FAcQa totalizaram 613,8 mg, resultando em 76,72% de eficiência.

As sub-frações Qa 1, Qa 5 e Qa 6 foram selecionadas de acordo com seu grau de pureza, verificado por meio da CCD juntamente com os reveladores de radiação ultravioleta em 254 e 365 nm, vapor de iodo e anisaldeído, e enviados ao Departamento de Química da USP em Ribeirão Preto, para análise espectroscópica de IV e RMN ^1H e RMN ^{13}C , DEPT e as bidimensionais COSY, HMBC e HMQC.

Dentre as sub-frações analisadas, foi possível identificar uma substância (amostra **Qa 1**) por meio do espectros de IV (Figura 24) e RMN de ^1H , ^{13}C e de análises bidimensionais, além da comparação com dados da literatura.

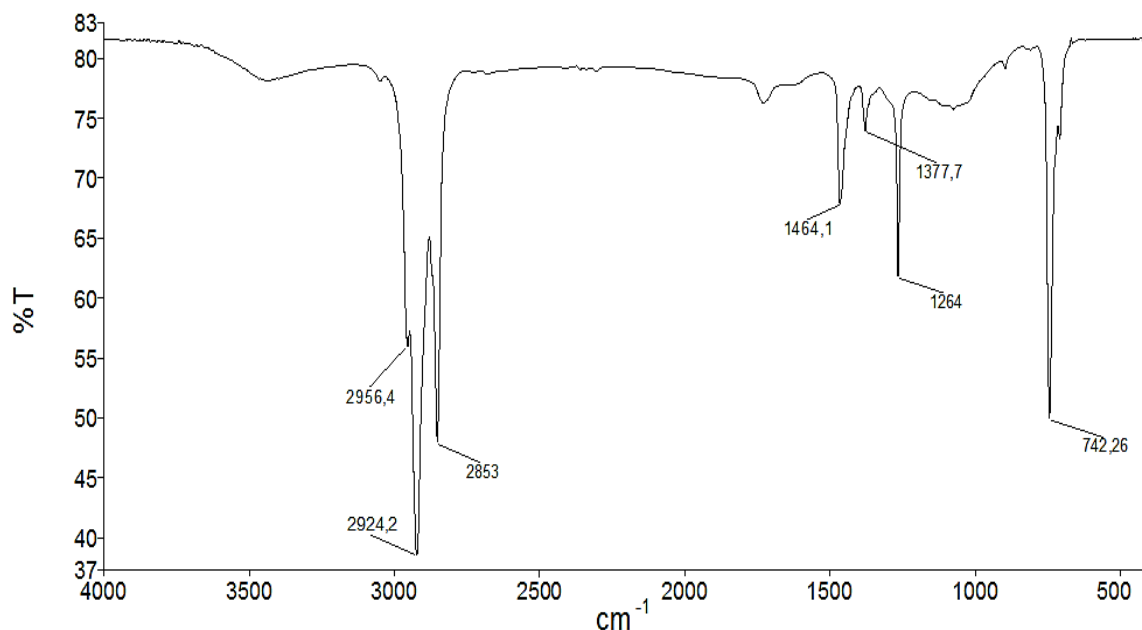


Figura 24 – Espectro de Infravermelho da amostra Qa1.

Para a classe dos alcanos, as vibrações mais características em um espectro de Infravermelho (IV) são proveniente das deformações axiais e angulares de ligações C-H (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

As vibrações das deformações axiais de C-H em alcanos, apresentam absorção na região de 3000 a 2840 cm^{-1} (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010).

Para os hidrocarbonetos saturados, grupamentos metila apresentam duas bandas distintas em aproximadamente 2962 e 2872 cm^{-1} . A primeira absorção é relacionada à deformações axiais assimétricas, e a segunda absorção é associada a deformações axiais simétricas. No espectro de IV da amostra Qa1, essas bandas são observadas em 2956,4 cm^{-1} (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Os grupos metilenos presentes em alcanos apresentam absorções em aproximadamente 2926 e 2853 cm^{-1} , correspondentes a deformações axiais assimétricas e simétricas, respectivamente. No espectro de IV da amostra, são observados absorções em 2924,2 e 2853 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

As bandas em aproximadamente 1375 e 1450 cm^{-1} correspondem a deformações angulares simétricas e assimétricas das ligações C-H, respectivamente. E as bandas entre 1350 e 1150 cm^{-1} correspondem a essas

deformações, simétricas e assimétricas, foras do plano. Na amostra Qa1 essa banda é observada em 1264 cm^{-1} (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Por fim, a banda de deformação angular assimétrica no plano nos espectros de hidrocarbonetos ocorrem em aproximadamente 720 cm^{-1} , sendo verificado a $742,26\text{cm}^{-1}$ no espectro da amostra Qa1 (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Por meio da integração dos picos no espectro de ^1H (Figura 25) foi possível constatar a presença de aproximadamente 38 hidrogênios na substância, uma vez que, segundo Pavia; Lampman; Kriz (2010) a área sob cada pico é proporcional a quantidade de hidrogênios que geram esse pico.

No espectro de ^1H (Figura 25), o tripleto em δ 0,88 (Ha) sugere a presença de grupos metila, e em δ 1,268 (Hb) o singleto sugere absorções de metileno, que se sobrepõem todos em um único pico. Desta forma, segundo Pavia; Lampman; Kriz (2010) situações como esta pode-se tratar de um hidrocarboneto.

Já para o espectro de ^{13}C (Figura 26), os deslocamentos de carbono metileno e metila, ambos sp^3 , foram de 15-55 e 8-30 ppm, respectivamente. Essa característica pode configurar o exposto por Silverstein; Webster (2000) e Pavia; Lampman; Kriz (2010), os quais preconizam que em geral, grupos CH_3 são mais blindados que grupos CH_2 , apresentando valores menores de deslocamentos. O tamanho relativo dos picos, geralmente remete-se ao número de cada tipo de átomo de carbono presentes no composto (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010), sugerindo que em δ 29,68 sobrepõem-se vários carbonos (Figura 26).

Analisando os espectros ^{13}C (Figura 26) e o mapa de correlação DEPT (Figura 26), pode-se inferir a presença de CH_3 (pico positivo no espectro DEPT) e CH_2 (picos negativos no espectro DEPT), entretanto, apresentam diferentes deslocamentos principalmente devido ao efeito da blindagem, pois o mesmo depende da densidade de elétrons em movimento (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Por outro lado, utilizando os espectros bidimensionais (COSY, HMBC e HMQC) (Figuras 28, 29 e 30), pode-se identificar a amostra **Qa 1** como o alcano octadecano (Figura 31).

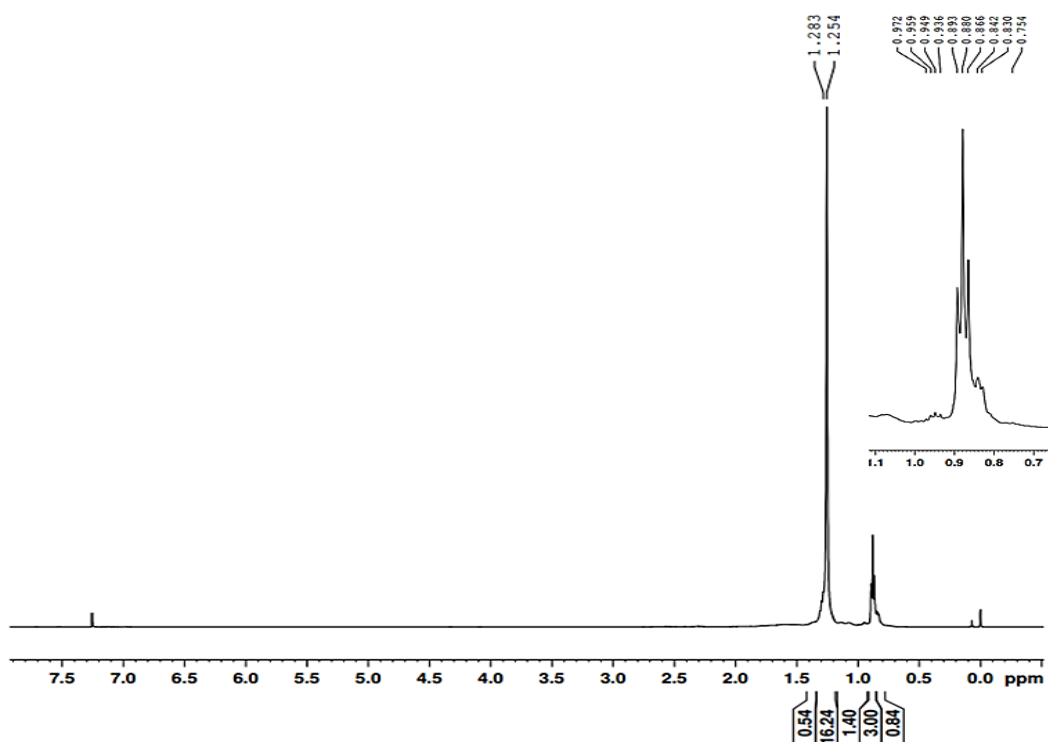


Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 ; 500,13 MHz) da Qa 1.

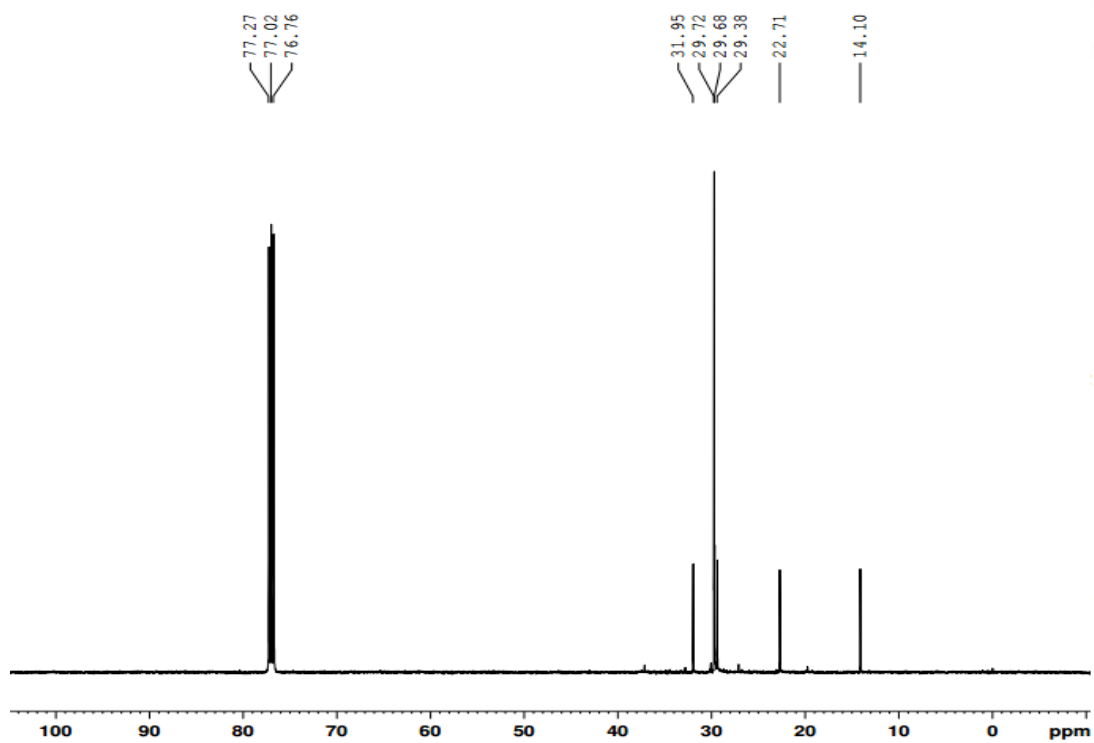


Figura 26 – Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.

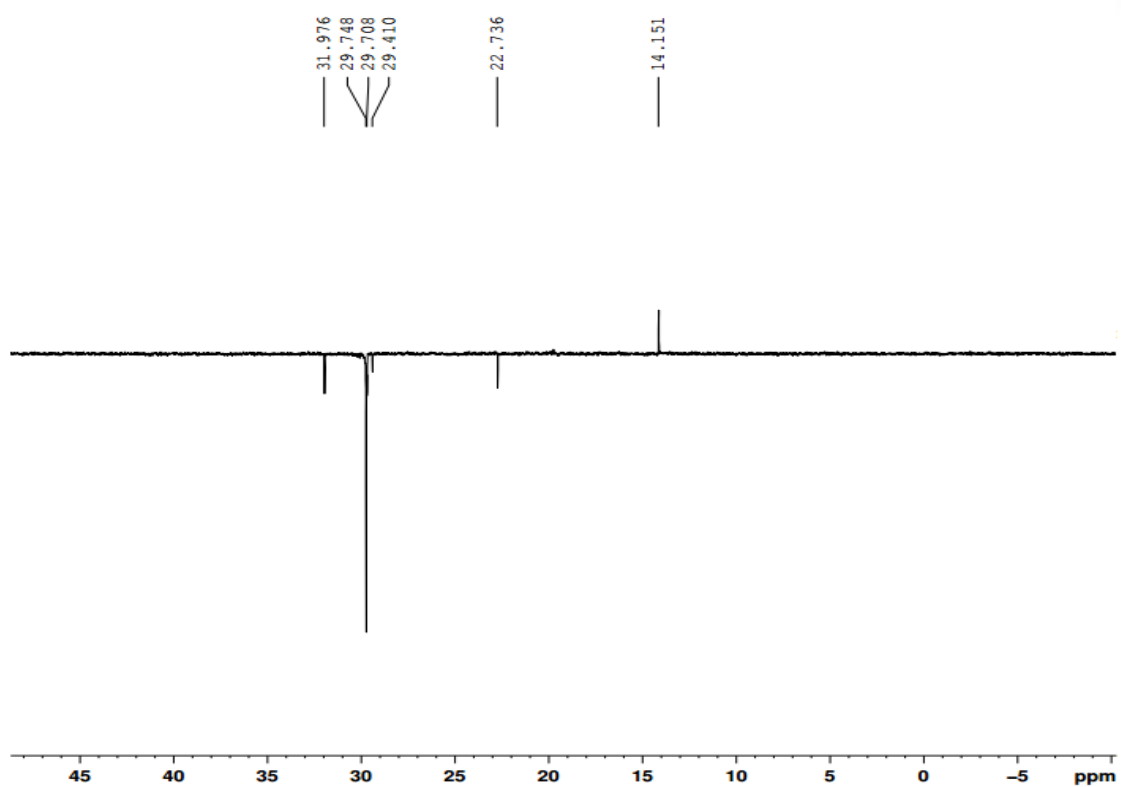


Figura 27– Espectro DEPT (CDCl_3 ; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.

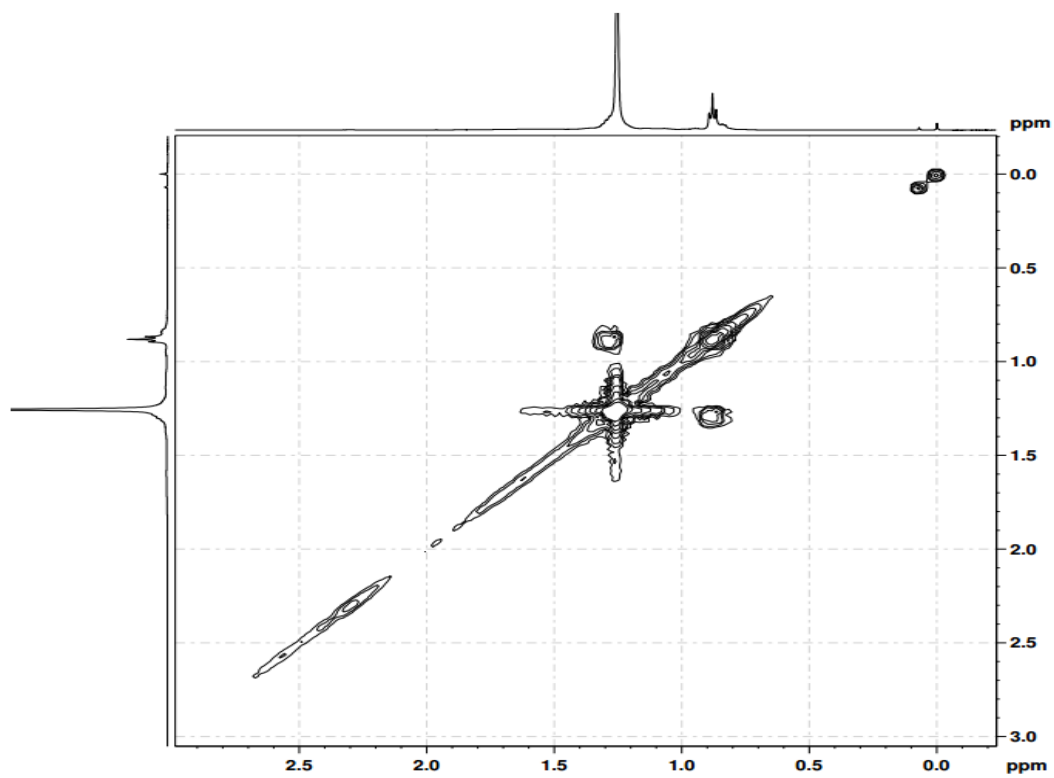


Figura 28 – Mapa de contornos COSY (CDCl_3 ; 500,13 MHz) da Qa 1.

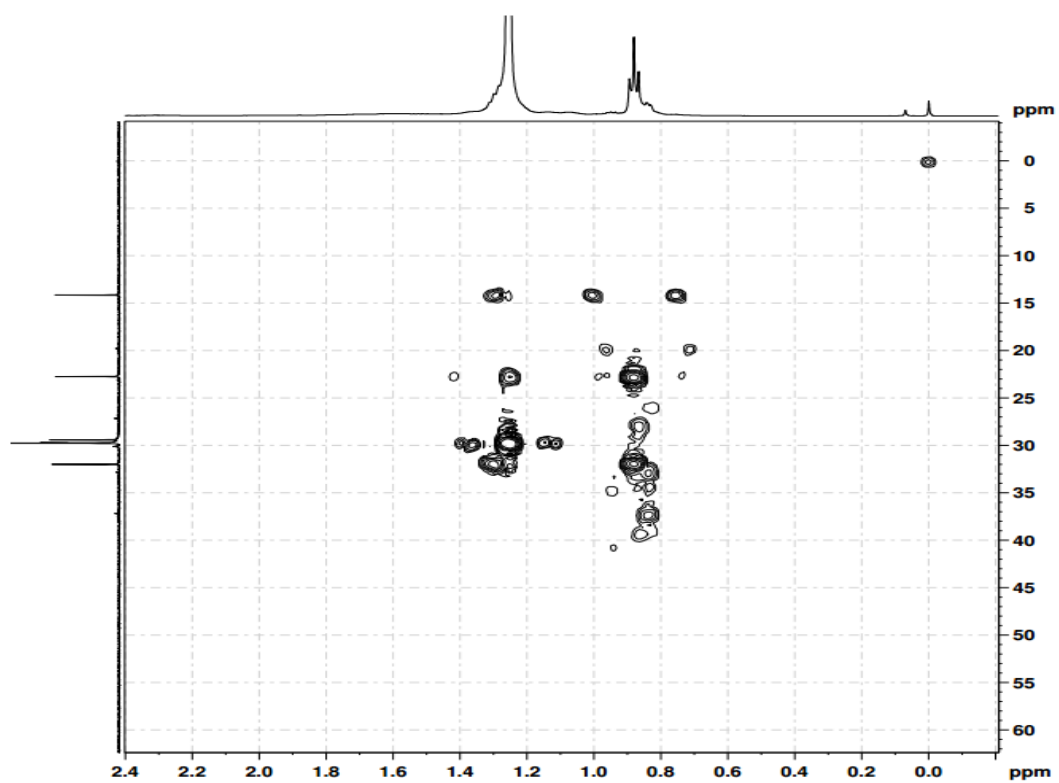


Figura 29– Mapa de contornos HMBC (CDCl₃; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.

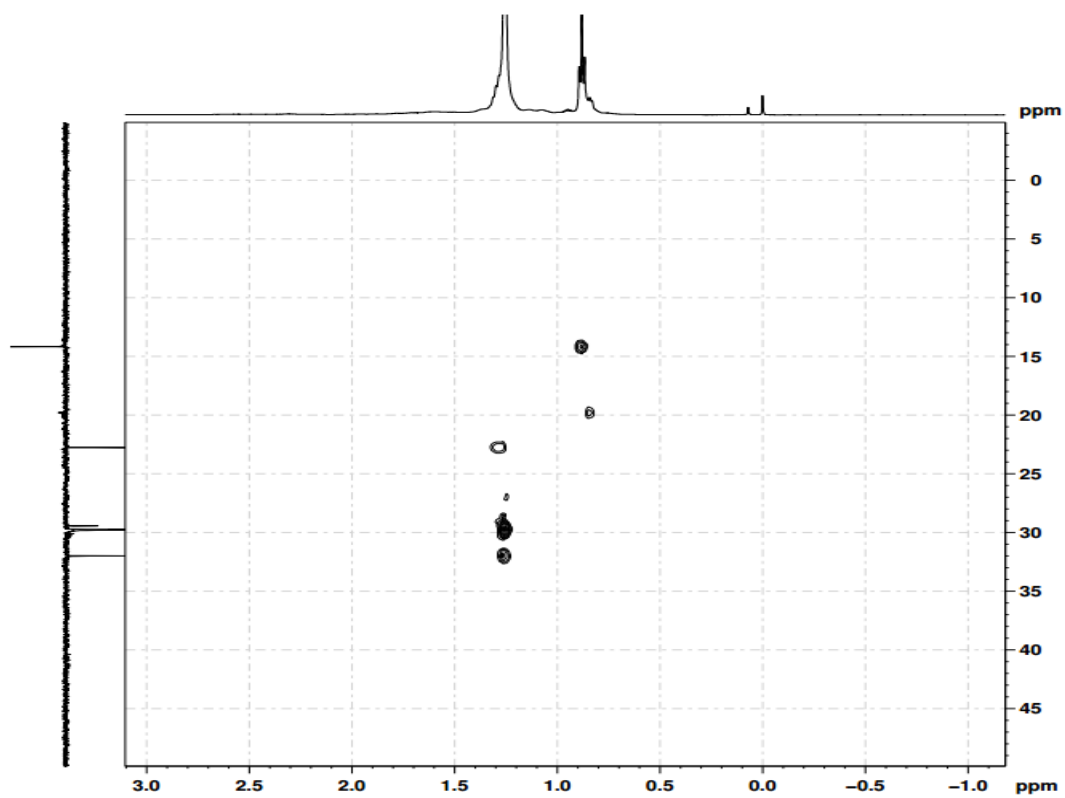


Figura 30– Mapa de contornos HMQC (CDCl₃; 125,75 e 500,13 MHz) da Qa 1.

Para verificar os deslocamentos químicos de ^{13}C dos hidrocarbonetos (lineares ou ramificados), utilizou-se a seguinte Equação (6):

$$\delta = -2,5 + \sum nA \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde:

δ : Deslocamento previsto para um determinado átomo de carbono;

A : Parâmetro de deslocamento aditivo;

n : Número de átomos de carbono que causa o deslocamento.

Os deslocamentos aditivos (A) são tabelados e nomeados para os hidrocarbonetos de acordo com a influência de seus átomos vizinhos a 1, 2, 3, 4 e 5 ligações: o efeito de α é de +9,1, β é de +9,4, γ é de -2,5, δ de +0,3 e ϵ de +0,1 (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

De acordo com a Eq. (6), o deslocamento teórico apresentado pelo C-5 é de 13,9 ppm, C-4 23 ppm, C-1 32,4 ppm, C-3 29,9 ppm e os C-2 na faixa de 30,3 ppm. Os deslocamentos apresentados no espectro ^{13}C (Figura 26) apresentam pouca diferença quando comparados aos deslocamentos calculados, comprovando a adequação das análises dos espectros e os dados teóricos.

A análise dos espectros, juntamente com os dados encontrados na literatura, demonstraram concordância com a substância octadecano (Figura 31).

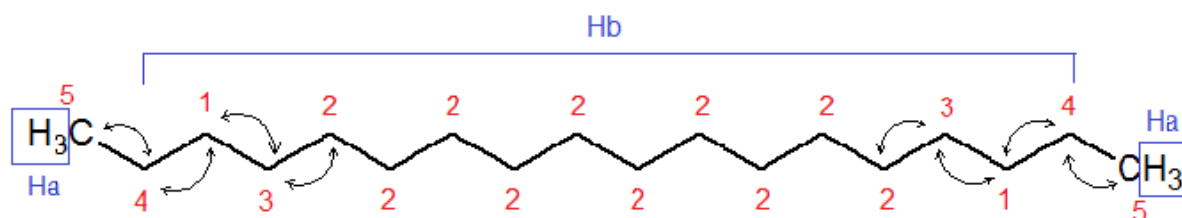


Figura 31 – Estrutura do composto Qa 1, identificado como octadecano.

Alguns alcanos já foram identificados em *Quassia amara*, dentre eles nonano, pentacosano, heptacosano e octacosano (ARAÚJO et al., 2007). Entretanto, a substância octadecano identificada não há registros na literatura para esta planta.

O octadecano já foi identificado em *Thymus vulgaris* L. (tomilho) (JAKIEMIU, 2008), raiz de *Flaveria bidentis* (XING et al., 2014), *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) (MARQUES, 2010), óleo essencial de *Spondias mombin* L. (cajá) e *Spondias sp* (cajarana do sertão) (BRITO, 2010) e *Moringa oleifera* L. (moringa) (BARRETO et al., 2009).

Zhen-Long et al. (2011) identificou algumas substâncias associadas a progressão da senescência das pétalas de *Gossypium spp.* L., conhecido como algodão Upland, e dentre essas substâncias está o octadecano.

A análise dos espectros das demais substâncias oriundas na FAcQa ainda estão em andamento, respeitando uma agenda de prioridades do Departamento de Química da USP. As demais análises fazem-se necessárias para que se possa identificar se há uma substância responsável pela atividade demonstrada pela planta, ou se essa atividade é atribuída ao efeito de sinergismo entre elas.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Devido as diversas maneiras que os compostos antioxidantes podem atuar, como complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, entre outras, há a necessidade de verificar tal atividade por diferentes métodos.

A atividade antioxidante do extrato metanólico de *Quassia amara* foi verificada pelos métodos: sequestro dos radicais ABTS e DPPH, poder de redução do ferro (FRAP) e auto oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (Tabela 9). Para fim de comparação, utilizou-se o antioxidante sintético TBHQ (terc-butilhidroquinona), amplamente utilizado na indústria alimentícia.

A avaliação da capacidade antioxidante por meio do método ABTS vem sendo muito aplicada na análise de vegetais, frutas, plantas e bebidas, devido sua alta sensibilidade, rapidez, produção de resultados confiáveis e utilização de um cátion radical muito estável (BOROSKI et al., 2015). Essa análise de atividade

antioxidante é medida por meio da capacidade da amostra em estabilizar o cátion radicalar ABTS presente na solução.

O extrato metanólico de *Quassia amara* apresentou atividade antioxidante de 550,03 $\mu\text{mol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$, resultado este inferior ao apresentado pelo antioxidante sintético TBHQ (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados referentes a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e β -caroteno para o extrato metanólico de *Quassia amara*.

	ABTS ($\mu\text{mol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$)**	DPPH ($\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$)**	FRAP ($\mu\text{mol de Fe}^{+2}\cdot\text{g}^{-1}$)**	β -caroteno/ácido linoleico (%)**
<i>Quassia amara</i>	550,03 ^b \pm 0,66	1898,02 ^a \pm 8,60	2025,41 ^b \pm 12,24	46,18 ^a \pm 2,52 [#]
TBHQ	4134,00 ^a \pm 37,50	1148,05 ^b \pm 2,98	3437,44 ^a \pm 24,48	44,32 ^a \pm 2,70 ^{##}

TEAC: Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox; ** Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão; Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). TBHQ: Terc -butilhidroquinona. Concentrações utilizadas: [#]0,004 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ^{##}1,25.10⁻⁴ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Ferrari (2013) estudou o extrato etanólico e diclorometânico de *Quassia amara*, e para a análise de ABTS obteve 618,91 e 38,61 $\mu\text{mol}\cdot\text{TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Por meio desses resultados e dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se inferir que os compostos presentes nesta planta capazes de estabilizar o radical ABTS são de natureza polar.

O radical estável DPPH é muito utilizado para mensurar a atividade antioxidante tanto em extratos como em substâncias isoladas, entretanto, deve-se levar em consideração que uma pigmentação forte do extrato pode interferir nos resultados, portanto, deve-se trabalhar com diluições (BORGES et al., 2011). O radical DPPH é um dos poucos radicais nitrogênicos orgânicos disponíveis, possui baixa taxa de deterioração e é estável, assim sendo, apenas fortes agentes redutores são capazes de reduzi-lo (BORGES et al., 2011; BOROSKI et al., 2015).

Neste estudo, para análise de atividade antioxidante pelo método de DPPH, o extrato metanólico de *Quassia amara* apresentou valor superior e estatisticamente diferente ao antioxidante sintético (Tabela 9).

O extrato etanólico de *Quassia amara* em Ferrari (2013) para análise de DPPH expresso em CI_{50} (Coeficiente de inibição - concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH') também apresentou valor superior ao antioxidante α -tocoferol utilizado para comparação. Demonstrando, portanto, que a planta possui compostos com considerável capacidade redutora.

Para conhecer a respeito da atividade antioxidante de uma amostra, é importante avaliar seu poder de redução, ou seja, sua capacidade em doar elétrons ou ser oxidada, pois muitas vezes as ações antioxidantes são favorecidas por reações redox (BOROSKI et al., 2015). Existem várias metodologias para determinar o poder de redução de antioxidantes utilizando o íon Fe^{3+} , dentre elas, destaca-se o método FRAP por se tratar de um metodologia barata, simples e rápida (BOROSKI et al., 2015).

Dentre as duas amostras analisadas, para o método FRAP, o antioxidante sintético TBHQ apresentou valor elevado e estatisticamente diferente do extrato metanólico de *Quassia amara* (Tabela 9).

O extrato etanólico de *Quassia amara*, em estudo de Ferrari (2013), para análise FRAP apresentou valor de $1774,44 \mu\text{mol de } Fe^{+2} \cdot g^{-1}$, valor este inferior ao encontrado no presente estudo (Tabela 9), demonstrando assim que o solvente metanol foi melhor para extrair compostos com capacidade redutora.

Albouchi et al. (2013) trabalharam com extrato metanólico da planta *Ailanthus altissima*, também pertencente a família Simaroubaceae, obtendo $327,5 \mu\text{mol de } Fe^{+2} \cdot g^{-1}$, e associaram tal atividade a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato por apresentarem propriedades redox. Fundamentando a considerável atividade encontrada no extrato metanólico de *Quassia amara*.

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico nos permite avaliar o potencial da amostra em inibir ou retardar a oxidação do β -caroteno quando em contato com os radicais peroxila formados pela oxidação do ácido linoleico (BOROSKI et al., 2015).

Os resultados obtidos nesta análise para o antioxidante sintético TBHQ e o extrato metanólico de *Quassia amara* não apresentaram diferença significativa entre si. Entretanto, deve-se levar em consideração a diferença da concentração utilizada para a realização da análise ($0,004 g \cdot mL^{-1}$ para o extrato metanólico de *Quassia amara* e $1,25 \cdot 10^{-4} g \cdot mL^{-1}$ para o antioxidante sintético TBHQ).

Dentre os constituintes químicos da *Quassia amara* estão os quassinoides, considerados marcadores taxonômicos da família Simaroubaceae, reconhecidos por sua ampla faixa de atividade biológica, incluindo atividade antioxidante (ALMEIDA et al., 2007). E para tal atividade, destaca-se a quassina, quassinóide majoritário da *Quassia amara* (ALMEIDA et al., 2007; GILBERT; FAVORETO, 2010), sendo esta, portanto, uma alternativa para substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria.

A busca por antioxidantes naturais tem aumentado atualmente, principalmente pelos aspectos associados à saúde, por se tratar de uma alternativa para o uso de antioxidantes sintéticos. Entretanto, principalmente para a indústria alimentícia, os antioxidantes sintéticos ainda possuem características importantes para sua utilização que os extratos naturais não apresentam, como estar em sua forma pura e não alterar as propriedades organolépticas dos produtos. Contudo, a incorporação de extratos naturais em substituição, total ou parcialmente, dos antioxidantes sintéticos agrega valor ao produto final visando a qualidade de vida do consumidor.

5.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana do extrato metanólico de *Quassia amara* foi determinada pelos métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella Bongori* (ATCC 43975). As concentrações bacterianas utilizadas no experimento foram de $1-2 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ na escala de *Mc Farland* e as concentrações do extrato metanólico de *Quassia amara* variaram de 0,0007 a 5 mg.mL⁻¹ (Figuras 32 e 33).

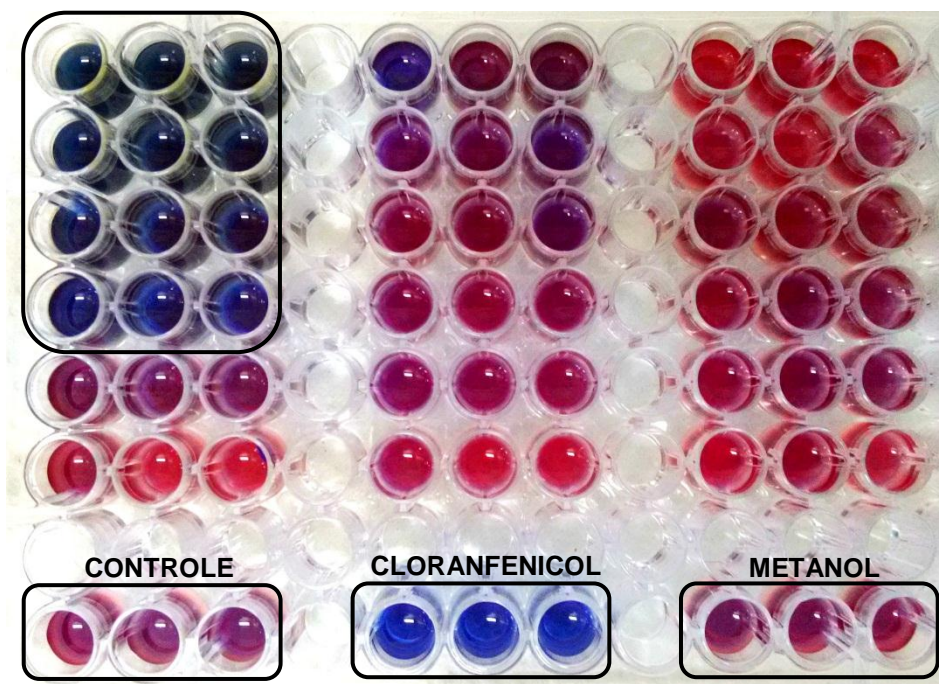


Figura 32 - Análise de CIM para a bactéria *Staphylococcus aureus*.

O método de microdiluição em microplacas é considerado um método com reprodutibilidade e deixa um registro permanente (OSTROSKY et al., 2008), pois a constatação da inibição é feita por comparação, utilizando como controle positivo o antibiótico cloranfenicol, que, com a adição do corante rezasurina, permanece com a coloração azul. Como controles negativos foram utilizados o meio somente com a bactéria e o meio com a bactéria adicionado o solvente metanol, para ressaltar que a inibição não sofre interferência do solvente.

Frente a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, o extrato metanólico de *Quassia amara* apresentou ação inibitória nas concentrações de 0,625 a 5 mg.mL⁻¹ (Figura 32), apresentando portanto uma CIM de 0,625 mg.mL⁻¹. Entretanto, o extrato não apresentou ação bactericida (CBM) em nenhuma das concentrações testadas.

Frente a bactéria gram-negativa *Salmonella bongori*, o extrato metanólico de *Quassia amara* apresentou ação inibitória nas concentrações de 0,312 a 5 mg.mL⁻¹ (Figura 33), apresentando portanto uma CIM de 0,312 mg.mL⁻¹. Porém pela análise de CBM, dentre as concentrações testadas, não houve ação bactericida

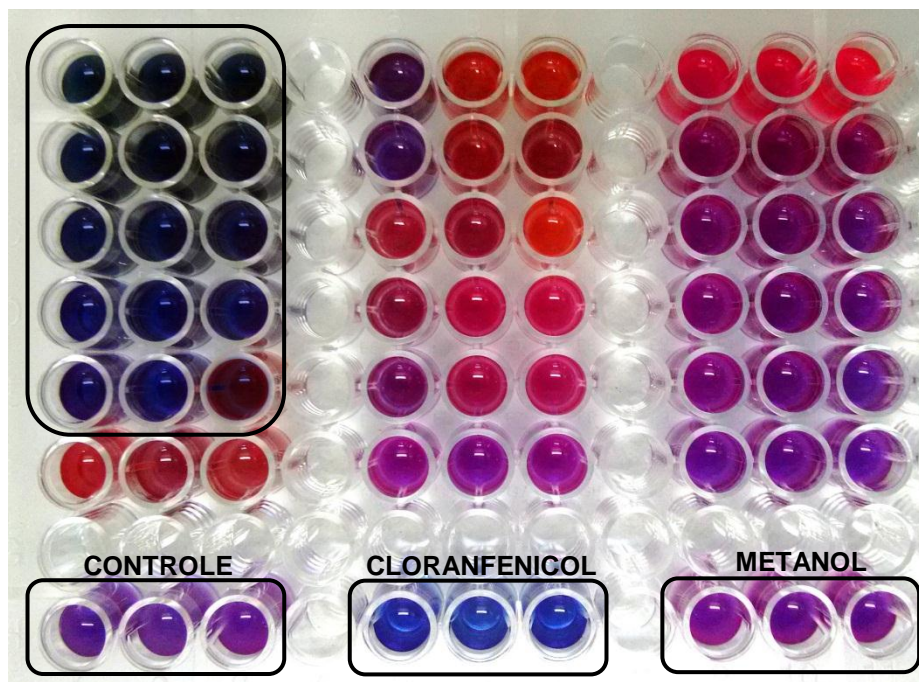


Figura 33 - Análise de CIM com a bactéria *Salmonella Bongori*.

Em estudo feito com as plantas do cerrado brasileiro, Arantes et al. (2005) verificou o potencial antimicrobiano do extrato diclorometânico de *Quassia amara* frente ao microrganismo *Mycobacterium fortuitum*, apresentando uma CIM de 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ferrari (2013) avaliou a atividade antibacteriana de extrato etanólico e diclorometânico de *Quassia amara*, apresentando CIM de 0,16 e $<0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente, frente a bactéria *Bacillus cereus*.

Arantes et al. (2005) atribuíram o considerável potencial antibacteriana e antimicrobiano de *Quassia amara* aos seus constituintes pertencentes as classes dos triterpenos e esteroides, os quais são melhores extraídos com solventes apolares, justificando os melhores resultados de atividade antibacteriana encontrados com o solvente diclorometano.

No presente estudo, o extrato metanólico de *Quassia amara* apresentou uma melhor CIM frente à bactéria gram-negativa, salientando o potencial antibacteriano do mesmo, pois, geralmente, as bactérias gram-negativas são mais resistentes a agentes externos devido à natureza mais complexa de sua parede celular (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Entretanto, não há na literatura muitos relatos a respeito da atividade antibacteriana e antimicrobiana de *Quassia amara*, sendo esta um potencial a ser

explorado. Visto que, atualmente, a descoberta por novos agentes com tal capacidade tem despertado o interesse tanto da indústria farmacêutica, devido a resistência de certos microrganismos aos antibióticos já existentes, como da indústria alimentícia, visando a busca por alternativas quanto a utilização de aditivos químicos capazes de inibir microrganismos em matrizes alimentares, prolongando assim sua vida útil.

5.5 APLICAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Quassia amara* EM ÓLEO DE SOJA

Para evitar os processos oxidativos e prolongar a vida útil de óleos e gorduras há a necessidade de minimizar os fatores que dão início a esses processos deteriorativos como exposição à luz, temperatura, evitar presença de traços de metais e bloquear a formação de radicais livres com a adição de antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006). Para isso, a indústria alimentícia utiliza de antioxidantes sintéticos como o BHT e TBHQ. Embora, esses antioxidantes sintéticos sejam efetivos em vários sistemas alimentícios, é sabido que eles possuem efeitos tóxicos devido sua reatividade em processos de oxi-redução. Desta forma, os indícios de problemas à saúde humana pelo consumo desses antioxidantes sintéticos, aliado há um crescente interesse do consumidor por produtos naturais impulsionam e justificam pesquisas científicas que buscam por compostos antioxidantes naturais visando sua aplicação em alimentos.

Desta forma, o efeito da adição do extrato de *Quassia amara* em óleo de soja refinado foi avaliado visando a substituição do antioxidante sintético TBHQ.

O extrato metanólico de *Quassia amara* foi liofilizado, até total eliminação do solvente, e rediluído em etanol para aplicação do mesmo no óleo de soja para a realização das análises.

Para esse estudo o óleo de soja refinado foi dividido em quatro tratamentos e submetidos ao teste acelerado de estufa. No primeiro e segundo tratamento o óleo de soja refinado foi adicionado de extratos metanólicos liofilizados de *Quassia amara* nas concentrações de 100 ppm (T1) e 200 ppm (T2), respectivamente. No terceiro tratamento o óleo de soja refinado foi adicionado do antioxidante sintético TBHQ na concentração de 200 ppm (T3). As devidas concentrações foram escolhidas por ser

a concentração de 200 ppm o limite máximo permitido pela legislação vigente para o uso de TBHQ em alimentos, no Brasil (ANVISA, 2005). No quarto tratamento o óleo de soja refinado foi isento de antioxidantes (chamado de controle) (T4).

Os tratamentos foram mantidos em estufa com circulação de ar a 65 ± 2 °C durante 96 horas e avaliados nos tempos 0, 48 e 96 horas por meio de índice de acidez, absorvância na faixa do ultravioleta (UV) e TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). O objetivo foi avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja, pois, segundo alguns autores (CHONG et al., 2015; EVANS et al., 1973; MEI et al., 2014; SILVA; JORGE, 2014; YIM et al., 2013), um dia sob tais condições de armazenamento (estufa com circulação de ar a 65 ± 2 °C) equivale a um mês de armazenamento a temperatura ambiente.

5.5.1 Índice de acidez

O índice de acidez está relacionado com o grau de pureza, qualidade, processamento e principalmente com o estado de conservação de óleos e gorduras (FARHOOSH; EINAFSHAR; SHARAYEI, 2009; O'KEEFE; PIKE, 2010; RIOS; PEREIRA; ABREU, 2013; SOARES et al., 2012). Esse índice, corresponde ao número de miligrama (mg) de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama de amostra (O'KEEFE; PIKE, 2010). O índice aumenta com a ocorrência de processos oxidativos, pois há maior formação de ácidos graxos livres, provenientes da decomposição dos glicerídeos (RIOS; PEREIRA; ABREU, 2013; SOARES et al., 2012).

Os quatro tratamentos, óleo de soja refinado adicionado com extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara* (100 e 200 ppm), adicionado com antioxidante sintético TBHQ e isento de antioxidantes (controle), foram analisados segundo o índice de acidez durante 96 horas, em intervalos de 0, 48 e 96 horas (Tabela 10).

Tabela 10 - Acidez (mg KOH.g⁻¹) dos quatro tratamentos de óleo de soja refinado mantidos em estufa a 65 ± 2 °C por 96 horas.

Tempo (h)	Acidez (mg KOH.g ⁻¹)			
	T1	T2	T3	T4
0	0,272 ± 0,00 ^{CA}	0,274 ± 0,00 ^{CA}	0,272 ± 0,00 ^{CA}	0,273 ± 0,00 ^{CA}
48	0,492 ± 0,05 ^{BB}	0,455 ± 0,05 ^{BC}	0,410 ± 0,03 ^{BD}	0,543 ± 0,00 ^{BA}
96	0,520 ± 0,00 ^{AB}	0,498 ± 0,07 ^{AC}	0,499 ± 0,06 ^{AC}	0,626 ± 0,07 ^{AA}

Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p<0,05) pelo teste Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente (p<0,05) pelo teste Tukey. T1: óleo de soja refinado adicionado 100 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T2: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T3: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de TBHQ, T4: óleo de soja refinado sem antioxidantes – controle.

Nota-se que, no tempo 0, não houve diferença estatística significativa entre os quatro tratamentos. Entretanto, no intervalo de 48 horas, os tratamentos já apresentaram diferença significativa entre si, com o tratamento controle (T4) apresentando o maior índice de acidez (0,543 ± 0,00 mg KOH.g⁻¹) e o tratamento com TBHQ (T3) o menor índice (0,410 ± 0,03 mg KOH.g⁻¹).

No intervalo de 96 horas, houve um aumento da acidez em comparação aos outros intervalos, porém, o tratamento controle (T4) manteve-se mais ácido em relação aos demais, seguido pelo tratamento T1 (extrato metanólico de *Quassia amara* adicionado na concentração de 100 ppm). Os tratamentos T2 (extrato metanólico de *Quassia amara* adicionado na concentração de 200 ppm) e T3 (com TBHQ) não diferiram estatisticamente entre si após as 96 horas de armazenamento, demonstrando assim que, nessa concentração, para a análise de acidez, o extrato metanólico de *Quassia amara* foi tão eficiente quanto o antioxidante sintético utilizado para comparação (Tabela 10).

Rocha; Almeida (2014) estudaram os efeitos da temperatura e da luminosidade nas características físico-químicas do óleo de soja durante o armazenamento, e para a análise de acidez em óleo de soja adicionado com antioxidante sintético TBHQ, obtiveram valores semelhantes ao presente estudo (0,23 ± 0,01 mg KOH.g⁻¹) no tempo zero.

Mei et al. (2014) investigaram as propriedades antioxidantes do extrato hidroalcolólico de rambutan, um fruto tropical comumente consumido em países

asiáticos, adicionado ao óleo de girassol e armazenados em estufa a 60 °C durante 24 dias. Para a amostra controle (sem adição de antioxidantes), após os 24 dias encontraram $0,57 \pm 0,05$ mg KOH.g⁻¹, e com a adição de 300 ppm do extrato bruto hidroalcolico de rambutan obtiveram $0,44 \pm 0,05$ mg KOH.g⁻¹, valores estes similares aos encontrados no controle (T4) e com a adição de 200 ppm do extrato de *Quassia amara* (T2) após 96 horas de armazenamento (Tabela 10).

Em avaliação da adição do extrato hidroalcolico de mangostão, fruta nativa do sudoeste da Ásia, em óleo de girassol, Chong et al., (2015) obtiveram, após 24 dias de armazenamento em estufa a 60 °C, para a amostra controle $0,73 \pm 0,05$ mg KOH.g⁻¹ e $0,49 \pm 0,02$ mg KOH.g⁻¹ com a adição de 200 ppm do extrato de mangostão. Embora realizado com óleo de girassol, os valores encontrados mostraram-se semelhantes aos encontrados no presente estudo.

O Codex Alimentarius (2016) e a ANVISA (2005) estabelecem o limite de acidez de 0,6 mg KOH.g⁻¹ de óleo para óleo vegetal refinado. Desta forma somente o tratamento controle (T4) após 96 horas em estufa com circulação de ar a 65 ± 2 °C extrapolou o limite permitido pelos órgãos de fiscalização.

5.5.2 Determinação da extinção específica por absorção na região ultravioleta (UV)

A análise espectrofotométrica de óleos fornece informações sobre seu estado de conservação e alterações promovidas durante seu processamento, uma vez que, o aumento da absorção nos comprimentos de ondas utilizados, 232 e 270 nm, indicam a presença de compostos resultantes do processo oxidativo do mesmo (ANDREO; JORGE, 2006; LUZIA; JORGE, 2009; MELLO; PINHEIRO, 2012; RAMALHO; JORGE, 2008; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2002; SOARES et al., 2012).

Os dienos, formados durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, apresentam absorvidade na faixa de 220 a 234 nm. Já os trienos, aldeídos e cetonas, compostos secundários da oxidação, apresentam máxima absorção a partir de 265 nm (MELLO; PINHEIRO, 2012; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2002; SOARES et al., 2012).

Foram realizadas as leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm dos quatro tratamentos óleo de soja refinado adicionado com extrato

metanólico liofilizado de *Quassia amara* (100 e 200 ppm), adicionado com antioxidante sintético TBHQ e isento de antioxidantes (controle), durante 96 horas, em intervalos de 0, 48 e 96 horas (Tabela 11).

Tabela 11- Absortividade no UV em 232 e 270 nm dos quatro tratamentos de óleo de soja refinado mantidos em estufa a 65 ± 2 °C por 96 horas.

Tratamentos	λ	Absortividade ($E^{1\%}_{1cm}$) [*]		
		0 hora	48 horas	96 horas
T1	232 nm	3,713 \pm 0,01 ^{bC}	5,392 \pm 0,00 ^{bB}	8,417 \pm 0,25 ^{cA}
	270 nm	1,144 \pm 0,08 ^{eC}	2,856 \pm 0,08 ^{eB}	6,572 \pm 0,15 ^{fA}
T2	232 nm	2,872 \pm 0,30 ^{cC}	4,906 \pm 0,01 ^{cB}	7,531 \pm 0,03 ^{dA}
	270 nm	0,944 \pm 0,03 ^{eC}	2,608 \pm 0,04 ^{fB}	6,044 \pm 0,04 ^{gA}
T3	232 nm	2,767 \pm 0,06 ^{cC}	4,450 \pm 0,03 ^{dB}	6,914 \pm 0,04 ^{eA}
	270 nm	1,125 \pm 0,02 ^{eC}	2,497 \pm 0,07 ^{fB}	6,644 \pm 0,04 ^{etA}
T4	232 nm	4,356 \pm 0,13 ^{aC}	6,908 \pm 0,13 ^{aB}	11,775 \pm 0,03 ^{aA}
	270 nm	2,222 \pm 0,03 ^{dC}	4,742 \pm 0,07 ^{cB}	8,761 \pm 0,02 ^{bA}

*Extinções específicas (absorbância de uma solução a 1% do óleo no solvente ciclohexano, numa espessura de 1 cm). Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. T1: óleo de soja refinado adicionado 100 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T2: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T3: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de TBHQ, T4: óleo de soja refinado sem antioxidantes – controle.

No tempo 0, os maiores valores, em ambas as absorbâncias, foram encontrados no tratamento controle, o quais apresentaram diferença estatística significativa dos demais. Os tratamentos adicionados com TBHQ (T3) e *Quassia amara* na concentração de 200 ppm (T2) demonstraram comportamento semelhante, não apresentando diferença estatística significativa entre si.

Após 48 horas mantidos em estufa com circulação de ar a 65 ± 2 °C, os valores mais elevados de absorbâncias foram encontrados no T4, e os tratamentos adicionados com TBHQ (T3) e *Quassia amara* na concentração de 200 ppm (T2)

não apresentaram diferença estatística significativa no comprimento de onda de 270 nm.

Ao final da análise, após 96 horas de incubação, os maiores valores foram encontrados no tratamento controle (T4), como nos demais intervalos, demonstrando assim que nos outros tratamentos houve uma inibição da oxidação quando comparados ao controle. E somente os tratamentos adicionados de TBHQ (T3) e *Quassia amara* na concentração de 100 ppm (T1) não apresentaram diferença estatística significativa no comprimento de onda de 270 nm.

Em estudo sobre o efeito da adição de extrato metanólico de semente de limão em óleo de soja sob processo de termoxidação Luzia; Jorge (2009), para a análise de dienos conjugados, após 20 horas a 180 °C os tratamentos controle, adicionado com TBHQ (50 mg.kg⁻¹) e com extrato metanólico de limão (2.400 mg.kg⁻¹) apresentaram os valores 3,02%, 2,93% e 2,49%, respectivamente, não apresentaram diferença estatística significativa entre si. Concluindo que a concentração testada, tanto do antioxidante sintético como do extrato de limão, não mostraram-se eficientes para inibir a oxidação do óleo de soja em tais condições.

Anwar et al. (2016) em estudo sobre as características de óleos oriundos de diferentes variedades de soja, encontrou valores de 1,50% a 1,91% para dienos conjugados e 0,41% a 0,65% para trienos conjugados. As diferenças podem ser explicadas pelas propriedades genéticas de cada soja, e com isso, pode-se escolher a melhor variedade de grão de acordo com a finalidade destinada a cada óleo.

A adição de extrato metanólico de gergelim em óleo de soja foi também investigada utilizando a análise de dienos e trienos conjugados, e após 72 horas incubados a 70 °C, para o comprimento de onda de 232 nm o tratamento controle, adicionado de TBHQ (200 ppm) e extrato metanólico de gergelim (200 ppm) apresentaram os valores 15,84%, 10,10% e 10,30%, respectivamente. E para o comprimento de onda de 270 nm, apresentaram os valores 10,34%, 6,70% e 6,86% (ABDELAZIM; MAHMOUD; RAMADAN-HASSANIEN, 2013). Igualmente como ocorreu no presente estudo, onde os tratamentos analisados exibiram menores absorvâncias quando comparados ao controle, demonstrando assim que houve menor formação de compostos provenientes do processo de oxidação do óleo de soja.

Os órgãos reguladores não estabelecem limites de dienos e trienos conjugados para o óleo de soja refinado, entretanto a análise mostra-se eficiente para acompanhar a formação de compostos resultantes da oxidação dos mesmos.

5.5.3 TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido 2-tiobarbitúrico)

A rancidez oxidativa, que ocorre em óleos, gorduras e produtos que as contém, é um processo que limita a vida útil e promove alterações na qualidade dos alimentos, tanto no valor nutricional, quanto as perceptíveis sensorialmente (SOARES et al., 2012).

O malonaldeído é um dos principais produtos formados durante o processo oxidativo, e o mesmo pode ser mensurado por meio da reação com ácido 2-tiobarbitúrico, pois a reação produz um composto de cor avermelhada que poder ser medido espectrofotometricamente a 532 nm (MEI et al., 2014; MOHAMMADI et al., 2016; WU et al., 2016). A análise de TBARS tem sido utilizada largamente como marcador de estresse oxidativo em diversas matrizes alimentares (MEI et al., 2014; SOARES et al., 2012; WU et al., 2016).

No presente trabalho, a análise de TBARS foi realizada com os quatro tratamentos, óleo de soja refinado adicionado com extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara* (100 e 200 ppm) T1 e T2 respectivamente, o tratamento adicionado com antioxidante sintético TBHQ (T3) e o tratamento isento de antioxidantes (controle) (T4), durante 96 horas, e avaliados em intervalos de 0, 48 e 96 horas (Figura 34).

Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

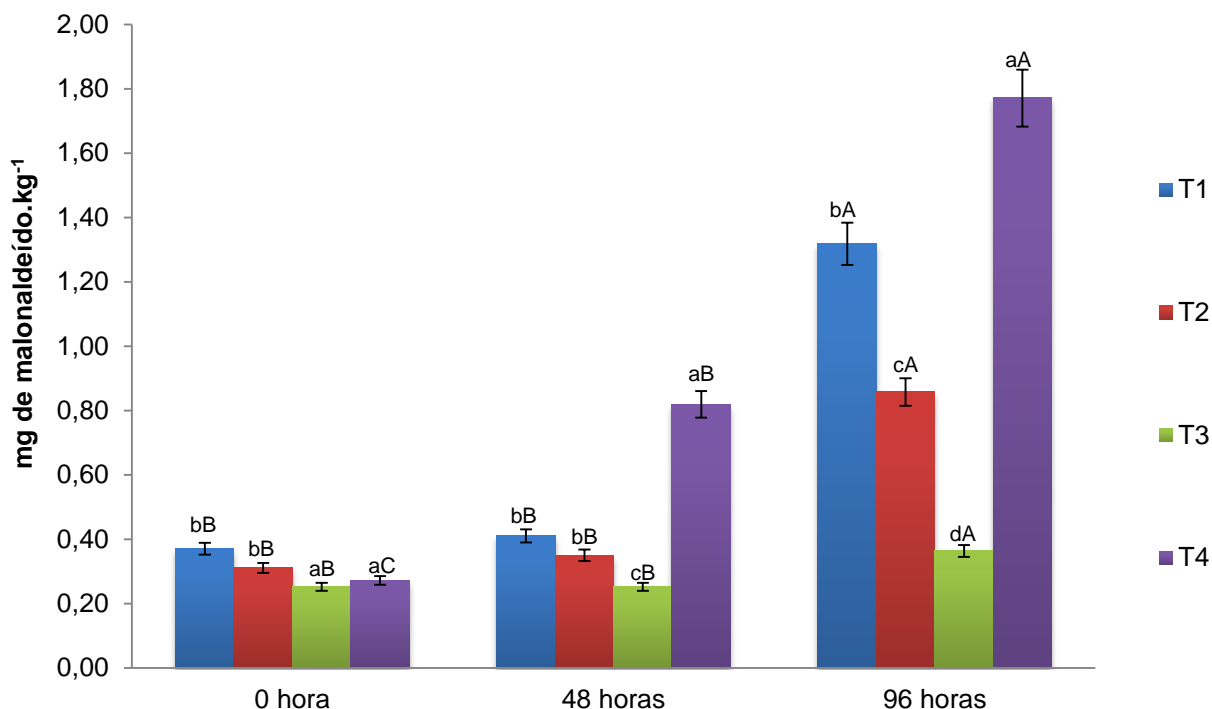


Figura 34- Valores de TBARS do óleo de soja refinado submetido aos diferentes tratamentos.

T1: óleo de soja refinado adicionado 100 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T2: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T3: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de TBHQ, T4: óleo de soja refinado sem antioxidantes – controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tempo de armazenamento ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

No início da análise, 0 hora, o tratamento controle não diferiu estatisticamente da amostra adicionada TBHQ. E os tratamentos T1 e T2 não apresentaram diferença estatística significativa entre si (Figura 34).

Após 48 horas, o tratamento controle já diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando o maior valor de malonaldeído entre os quatro (0,819 mg de malonaldeído.kg⁻¹). Validando assim que houve menor formação de malonaldeído nos demais tratamentos, e, portanto, maior inibição do processo oxidativo (Figura 34).

Ao final da análise, 96 horas de incubação, os quatro tratamentos exibiram diferença estatística significativa entre si, sendo o maior valor de malonaldeído apresentado pelo tratamento controle (1,771 mg de malonaldeído.kg⁻¹) e o menor valor pelo tratamento adicionado o antioxidante sintético TBHQ (0,364 mg de malonaldeído.kg⁻¹) (Figura 34).

Dentre os dois tratamentos adicionados com extrato metanólico de *Quassia amara*, T1 e T2, observa-se que, após as 96 horas, a concentração de 200 ppm conseguiu melhor inibir a oxidação lipídica, apresentando o menor valor de malonaldeído (0,857 mg de malonaldeído.kg⁻¹).

Mohammadi et al. (2016) estudaram o efeito da adição de extrato nano-encapsulado de folha de oliveira no controle da estabilidade oxidativa em óleo de soja, e para a análise de TBARS, após 20 dias a 60 °C, a amostra de óleo de soja adicionado com extrato nano-encapsulado na concentração de 300 ppm demonstrou comportamento semelhante a amostra adicionada o antioxidante sintético TBHQ na concentração de 200 ppm. Os autores atribuem tal atividade a liberação controlada de compostos bioativos presentes das folhas de oliveira devido a nano-encapsulação.

Em estudo sobre a utilização dos extratos etanólico e metanólico de *Satureja hortensis* L., (planta tradicionalmente utilizada na medicina popular na região do Irã), em substituição a antioxidantes sintéticos utilizados no óleo de soja, Kamkar et al. (2014) constataram que na concentração de 400 ppm, o extrato metanólico mostrou-se tão eficiente na inibição da oxidação lipídica do óleo quanto o antioxidante sintético BHT (*butylated hydroxytoluene*) após 49 dias a 60 °C.

Resultado semelhante foi encontrado por Kamkar et al. (2013), onde investigaram a ação do extrato aquoso de *Pulicaria gnaphalodes* L., também utilizada na medicina tradicional do Irã, na inibição da oxidação lipídica do óleo de soja durante armazenamento a 65 °C. E, na concentração de 400 ppm, o extrato aquoso apresentou eficácia semelhante ao BHT (200 ppm) após 35 dias de incubação.

Apesar dos tratamentos adicionados com extrato metanólico de *Quassia amara* não apresentarem efeito inibitório tão satisfatório quanto o antioxidante sintético, os mesmos apresentaram valores de malonaldeído menores quando comparados ao tratamento controle, demonstrando que houve efeito inibitório na oxidação lipídica do óleo de soja. Deve-se atentar também que a concentração adicionada de *Quassia amara* que apresentou melhor efeito inibitório (200 ppm) é a mesma concentração permitida para a adição do TBHQ, e que portanto, há a necessidade de pesquisas com maiores concentrações para a averiguação de melhores resultados.

5.5.4 Análise Sensorial

A qualidade sensorial de um produto afeta diretamente sua aceitação e preferência pelos consumidores (OUYANG; CHEN; ZHAO, 2016). E tais qualidades, como cor, aroma, gosto e sabor são mensuradas por meio da análise sensorial, sendo esta, portanto, de grande relevância para a indústria alimentícia, pois exerce importância desde o desenvolvimento de um novo produto até o controle de qualidade de um produto que já está no mercado (ARES et al., 2016; OUYANG; CHEN; ZHAO, 2016; TEIXEIRA, 2009).

Em razão disso, um painel composto por julgadores treinados faz-se necessário para avaliar, de forma confiável, tais atributos sensoriais (ETAIO et al., 2010; MOJET et al., 2015).

Entretanto, o processo de seleção, treinamento, qualificação e validação, requerido para se obter um painel sensorial confiável, é reconhecido como demorado, caro e não prático em alguns casos (KAMRUZZAMAN et al., 2013). Por consequência, as referências para seleção e treinamento, mostrando os detalhes do processo, são muito limitadas na literatura (ETAIO et al., 2010, TALSMA, 2016).

No presente estudo, os quatro tratamentos, óleo de soja refinado adicionado com extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara* (100 e 200 ppm), adicionado com antioxidante sintético TBHQ, e isento de antioxidantes (controle), foram avaliados quanto ao sabor ranço, por meio de teste discriminativo com escala hedônica não estruturada de 10 cm (HOUGH; FISZMAN, 2005), e quanto ao gosto amargo utilizando o teste de ordenação, por sete julgadores treinados.

A seleção dos julgadores foi realizada utilizando teste triangular, onde as duas amostras diferentes tratava-se de óleo de girassol já rancificado (preparado em estufa com circulação de ar a 60 °C durante 14 dias (HOUGH, FISZMAN, 2005) dentro de um recipiente de vidro âmbar aberto (KRICHENE et al., 2010)), e óleo de girassol comum. Três amostras, em ordem aleatória, através de 10 repetições, foram apresentadas aos julgadores, onde duas amostras eram iguais, tendo que ser identificada a amostra diferente.

Para o treinamento da equipe já selecionada, utilizou-se a escala não estruturada de 10 cm, apresentada com os números 0 e 10 nos extremos (HOUGH, FISZMAN, 2005). Foram fornecidas aos julgadores quatro diluições com óleo de

girassol, sendo elas: 0% de óleo rancificado, 10% de óleo rancificado, 50% de óleo rancificado e 100% de óleo rancificado, durante três dias e em triplicata no dia, para ser verificação da precisão das respostas e consistência da equipe. As diluições de 0 e 100% foram apresentadas como os extremos da escala, e as diluições restantes, 10 e 50%, os julgadores colocavam na escala de acordo com a intensidade do defeito ranço.

A validação do painel sensorial foi realizada com os quatro tratamentos de óleo de soja (controle, TBHQ e adicionado de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*) e hambúrgueres de peixe (em diferentes tempos de estocagem), para que estes pudessem identificar o defeito ranço em mais de uma matriz alimentar.

O painel final formado constitui-se por sete julgadores, que se mostraram capazes de identificar e diferenciar sabor ranço em ambas as amostras utilizadas para validação.

Para a análise sensorial dos óleos, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à 65 ± 2 °C (CHONG et al., 2015; MEI et al., 2014; YIM et al., 2013) e avaliadas quanto ao sabor ranço (Figura 35), durante 96 horas (IQBAL; BHANGER, 2007) com intervalos regulares de 0, 48 e 96 horas, em triplicata.

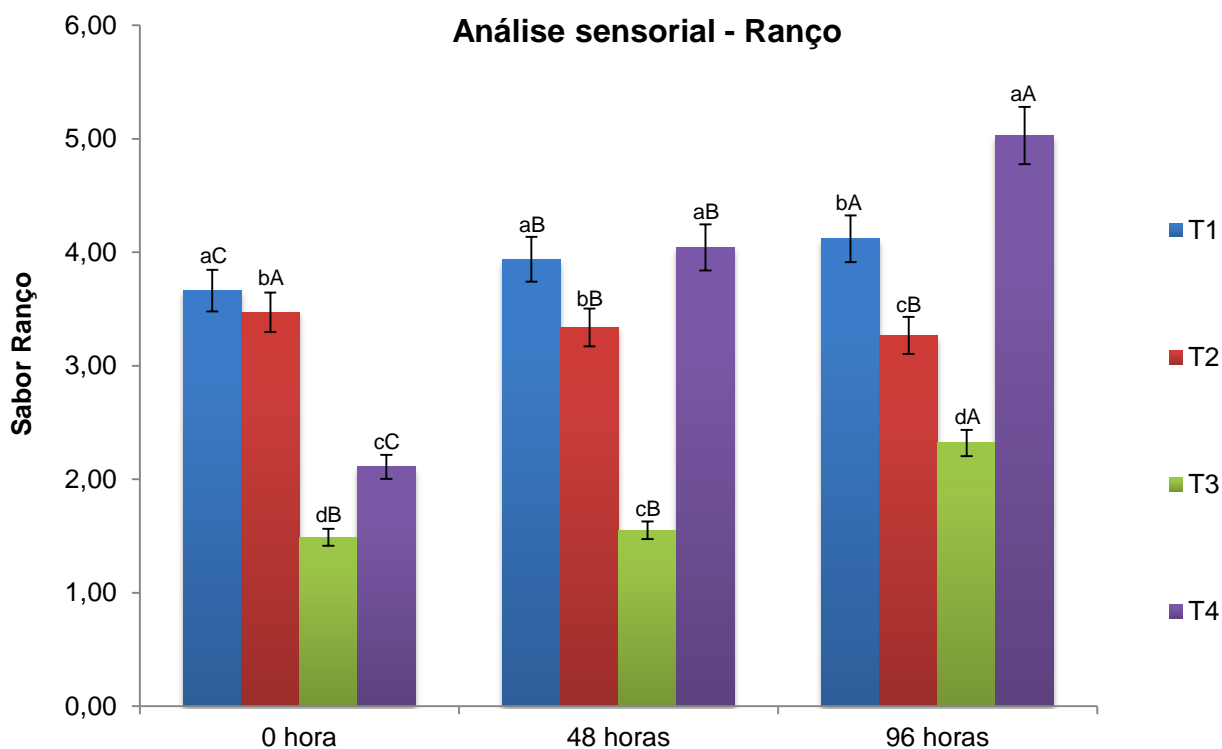


Figura 35- Valores da análise sensorial dos tratamentos avaliados quanto ao sabor ranço.

T1: óleo de soja refinado adicionado 100 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T2: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T3: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de TBHQ, T4: óleo de soja refinado sem antioxidantes – controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tempo de armazenamento ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

No primeiro intervalo da análise sensorial, 0 hora, os quatro tratamentos apresentaram diferença estatística significativa entre si, sendo o tratamento com adição de 100 ppm de *Quassia amara* (T1) identificado pelo painel treinado como mais rancificado ($3,66 \pm 0,68$ na escala de 10 cm), e o tratamento adicionado com TBHQ (T3), o tratamento menos rancificado ($1,49 \pm 0,34$ na escala de 10 cm) (Figura 35).

Após 48 horas de incubação, somente o tratamento adicionado com TBHQ (T3) não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao primeiro intervalo de análise. Nos demais tratamentos houve a identificação do aumento do ranço pelos julgadores treinados (Figura 35).

Ainda no segundo intervalo, 48 horas de incubação, os tratamentos T1 ($3,94 \pm 0,18$ na escala de 10 cm) e T4 ($4,04 \pm 1,45$ na escala de 10 cm) não apresentaram diferença estatística significativa entre si (Figura 35).

No último intervalo de realização da análise sensorial, 96 horas, os quatro tratamentos apresentaram diferença estatística significativa entre si, sendo o tratamento controle (T4) identificado como mais rancificado ($5,03 \pm 3,14$ na escala de 10 cm), seguido do T1 ($4,12 \pm 1,53$ na escala de 10 cm), T2 ($3,27 \pm 1,37$ na escala de 10 cm) e o T3 ($2,32 \pm 1,74$ na escala de 10 cm), em ordem decrescente.

Augusto (2013) avaliou a adição de extrato hidroalcóolico de *murtilla* em óleo de soja, visando a aceitação do produto, por um painel de seis julgadores treinados quanto a característica odor (ranço) em óleos e gorduras. Foi realizado um teste discriminativo por meio de escala não estruturada de 9 cm. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa na aceitação entre as diferentes concentrações adicionadas do extrato (150 e 200 ppm) após 96 horas, contudo, de acordo com as observações feitas pelo painel de julgadores treinados, é possível afirmar que o odor agradável da fruta mascarou o odor do ranço.

Sichieri (2013) avaliou o grau de oxidação de óleo de soja adicionado com extratos hidroalcóolicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça (100 ppm), armazenados durante 7 meses, por quadro de oito julgadores treinados quanto ao odor (ranço), utilizando escala de ordenação. Após os sete meses, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos adicionados com os extratos, mas, quando comparado ao tratamento adicionado com TBHQ, este apresentou maior aceitação pelo painel de julgadores.

López-Aguilar et al. (2007) encontraram 5,89 a 6,58 cm (em uma escala de 10 cm) para sabor ranço em óleos comerciais, após 12 semanas de armazenamento por quadro de oito julgadores treinados.

Neste estudo, avaliadores treinados atribuíram valores menores aos óleos com antioxidante sintético TBQH e extrato de *Quassia amara* (100 e 200 ppm) após 96 horas de análise. E, comparados ao tratamento controle, os julgadores identificaram menos sabor de ranço nos demais tratamentos, atestando a eficiência dos mesmos.

Entre as concentrações adicionadas do extrato de *Quassia amara*, após as 96 horas de análise, nota-se que o sabor ranço foi menos detectado no tratamento com adição de 200 ppm (Figura 35).

Um teste de ordenação quanto ao gosto amargo também foi aplicado nas amostras (Figura 36), para verificar se os extratos influenciariam no gosto do óleo,

pois a planta *Quassia amara* é rica em quassinoides, compostos estes que são reconhecidos devido seu amargor (ALMEIDA et al., 2007; ALVES et al., 2014).

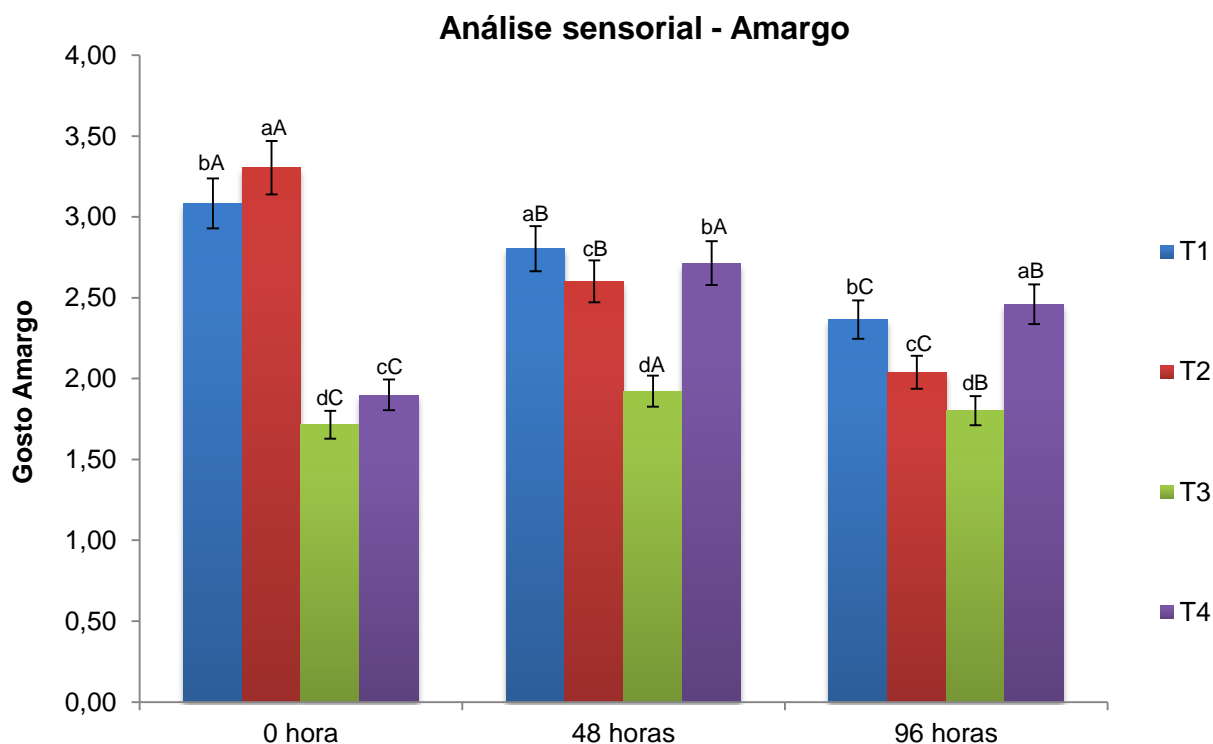


Figura 36- Valores da análise sensorial dos tratamentos avaliados quanto ao gosto amargo.

T1: óleo de soja refinado adicionado 100 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T2: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de extrato metanólico liofilizado de *Quassia amara*, T3: óleo de soja refinado adicionado 200 ppm de TBHQ, T4: óleo de soja refinado sem antioxidantes – controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tempo de armazenamento ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

De acordo com os resultados apresentados pelo painel de julgadores, nota-se que, no primeiro intervalo de análise, houve a maior identificação do amargo no tratamento com T2, seguido do tratamento T1. Evidenciando que, em um primeiro momento, a adição dos extratos influenciou no gosto dos óleos (Figura 36).

Após 48 horas de incubação, houve uma diminuição da percepção do amargo por parte dos julgadores, quando comparado ao primeiro intervalo de análise (Figura 36).

E, após 96 horas, houve a menor percepção do amargo entre os três intervalos de análise. Entretanto, o amargo foi mais perceptível no tratamento controle, concluindo que, após esse tempo de incubação, o amargor apresentado

pela planta não mais interferiu no gosto do óleo. Isso se confirma, pois, entre os tratamentos adicionados extrato de *Quassia amara*, a maior percepção do gosto amargo foi identificada no tratamento com 100 ppm (Figura 36). Podendo, portanto, o sabor do ranço apresentar maior interferência no gosto do óleo do que o amargo apresentado pela planta.

Analisando os resultados dos tratamentos com a adição do extrato de *Quassia amara* em óleo de soja refinado, tanto para as análises químicas quanto para a análise sensorial, a adição da concentração de 200 ppm apresentou os melhores resultados, embora inferiores aos resultados apresentados pela adição do antioxidante sintético TBHQ.

Entretanto deve levar em consideração que o antioxidante sintético apresenta-se em sua forma pura e já são adicionados aos produtos com o único objetivo de retardar o aparecimento de alterações oxidativas. Já a incorporação de antioxidantes naturais, além de contribuir retardando o processo oxidativo, ainda apresenta apelos associados a manutenção da saúde e prevenção de doenças.

6 CONCLUSÃO

Por meio da otimização da extração de compostos com atividade antioxidante de *Quassia amara*, utilizando o delineamento fatorial, foi possível conhecer as melhores condições de extração e adquirir mais conhecimento a respeito da amostra analisada.

A análise CLAE, utilizando curva de calibração com vários padrões autênticos de compostos fenólicos, possibilitou a identificação e quantificação dos compostos ácido gálico e catequina, os quais já são reconhecidos por apresentarem capacidade antioxidante, entre outras atividades.

Utilizando técnicas de cromatografia aliada a análise espectroscópica de RMN ^1H e RMN ^{13}C , juntamente com as bidimensionais, suscitou no isolamento e identificação inédita do alceno octadecano no extrato metanólico da planta *Quassia amara*.

Quanto a atividade antioxidante apresentada pelo extrato metanólico, destaca-se a análise de sequestro do radical DPPH, onde o extrato apresentou atividade superior ao antioxidante sintético TBHQ, e a análise oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, onde o antioxidante sintético e o extrato metanólico de *Quassia amara* não apresentaram diferença significativa entre si. Destacando assim, a atividade apresentada pelo mesmo.

O extrato apresentou atividade antibacteriana frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Bongori*, e, não se encontra na literatura muitos estudos a respeito da atividade antibacteriana de *Quassia amara*, sendo este um potencial a ser explorado.

Por fim, o extrato metanólico de *Quassia amara* conseguiu retardar a oxidação lipídica do óleo de soja. Tal capacidade pôde ser confirmada tanto pelas análises químicas como pela análise sensorial. Entretanto, faz-se necessário novos estudos empregando novas concentrações do extrato para estabelecer a concentração que melhor apresente capacidade de retardar a oxidação lipídica tanto em óleo de soja como em outras matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIM, A. A.; MAHMOUD, A.; RAMADAN-HASSANIEN, M. F. Oxidative stability of vegetable oils as affected by sesame extracts during accelerated oxidative storage. **J Food Sci Technol**, v. 50, n. October, p. 868–878, 2013.
- AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7286-7292, 2004.
- ALBOUCHI, F.; HASSEN I.; CASABIANCA H.; HOSNI K. Phytochemicals, antioxidant, antimicrobial and phytotoxic activities of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle leaves. **South African Journal of Botany**, v. 87, p. 164–174, 2013.
- ALBUQUERQUE, B. R.; PRIETO, M.A.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A.; CURRAN, T. P.; BARROS, L. F.; ISABEL, C.F.R.; Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. **Industrial Crops and Products**, 2016.
- ALCALDE, M. T.; POZO, A. DEL. Vinagre de quassia como tratamiento cosmético natural contra los piojos. **Farmacia práctica formación permanente en dermofarmacia**, v. 26, p. 132–133, 2007.
- ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, Â. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 935–951, 2007.
- 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. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ALVES, I. A.B.S.; MIRANDA, H. M.; SOARES, L. A.L.; RANDAU, K. P. Simaroubaceae family: botany, chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 481–501, 2014.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th Edition Illinois, 2003.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B.CEPPA**, p. 319–336, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Aditivos em alimento**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas/aditivo-sem-alimentos13>>. Acessado em: 13 julho 2016.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 23**, de 15 de fevereiro de 2005. Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras - subcategoria creme vegetal e margarinas, 2005.

ANWAR, F.; KAMAL, G. M.; NADEEM, F.; SHABIR, G. Variations of quality characteristics among oils of different soybean varieties. **Journal of King Saud University – Science**, v. 28, p. 332–338, 2016.

ARANTES, V. P.; SATO, D. N.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; LEITE, C. Q. F. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 195–198, 2005.

ARAÚJO, V. F. de; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; PASTORE JR, F. **Plantas da Amazônia para Produção Cosmética -Uma Abordagem Química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia**. Projeto Non-Wood II – PD 31/99 Rev. (I), p.1-214, 2007.

ARES, G.; JAEGER, S. R.; ANTÚNEZ, L.; VIDAL, L.; GIMÉNEZ, A.; COSTE, B.; PICALLO, A.; CASTURA, J. C. Comparison of TCATA and TDS for dynamic sensory characterization of food products. **Food Research International**, v. 78, n. 2015, p. 148–158, 2016.

ARRUDA, C. S.; GARCEZ, W. S.; BARRERA--ARELLANO, D.; BLOCO, J. M. Industrial trial to evaluate the effect of oxygen concentration on overall quality of refined, bleached and desodorized soybean oil in PET bottles. **J Am Oil Chem Soc**, v. 83, n. 9, p. 8–11, 2006.

AUGUSTO, T. R. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcolico de murtila (*Ugni molinae Turcz*)**. 2013. 124 f. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba. 2013.

BALLESTEROS, L. F.; RAMIREZ, M. J.; ORREGO, C. E.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Journal of Food Engineering**. V. 199, p. 1-8, 2017.

BARBOSA, L. F.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Chemical Constituents of Plants from the *Genus simaba* (Simaroubaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 2163–2178, 2011.

BARRETO, M. B.; FREITAS, J. V. B. de; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; NUNES, E. P.; GRAMOSA, N. V. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. November, p. 893–897, 2009.

BELWAL, T.; DHYANI, P.; BHATT, I. D.; RAWAL, R. S.; PANDE, V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**. V. 2017, p. 115-12, 2016.

BERTANI, S.; HOUEL, E.; STIEN, D.; CHEVOLOT, L.; JULLIAN, V.; GARAVITO, G.; BOURDY, G.; DEHARO, E. Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 155–157, 2006.

BERTANI, S.; HOUEL, E.; BOURDY, G.; STIEN, D.; JULLIAN, V.; LANDAU, I.; DEHARO, E. *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) leaf tea: Effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 40–42, 2007.

BISWAS, A. K.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A. S. Effect of spice mix and curry (*Murraya koenigii*) leaf powder on the quality of raw meat and precooked chicken patties during refrigeration storage. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 278–292., 2006.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. De. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. de S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 29, n. Centro Científico Conhecer, p. 1–3, 2011.

BORRÀS, E.; MESTRES, M.; ACEÑA, L.; BUSTO, O.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; CALVO, A. Identification of olive oil sensory defects by multivariate analysis of mid infrared spectra. **Food Chemistry**, v. 187, p. 197–203, 2015.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos**. 1.ed. Appris, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRITO, H. R. de; **Caracterização química de óleos essenciais de *Spondias mombin* L., *Spondias purpurea* L. e *Spondias sp* (cajarana do sertão)**. Dissertação (mestre em Ciências Florestais). Universidade Federal de Campina Grande no CSTR – Centro de Saúde e Tecnologia Rural. PATOS-PB. 2010.

CECILIA, M.; BRUNING, R.; BITTENCOURT, G.; MOSEGUI, G. The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu – Paraná : the viewpoint of health professionals. **Ciência & Saúde Coletiva**, p. 2675–2686, 2012.

CERCATO, L. M.; WHITE, P. A. S.; NAMPO, F. K.; SANTOS, M. R. V. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil : Is there potential for obesity treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 286–296, 2015.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 169–186, 2006.

CHONG, Y. M.; CHANG, S. K.; SIA, W. C. M.; YIM, H. S. Antioxidant efficacy of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) peel extracts in sunflower oil during accelerated storage. **Food Bioscience**, v. 12, p. 18–25, 2015.

CLSI. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. **Norma M7-A6**. Vol. 23, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex Standart for Named Vegetables Oils, CODEX STAN 210-1999. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org>>. Acesso em: 14 maio 2016.

CORDEIRO, R.; FERNANDES, P. L.; BARBOSA, L. A. Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 727–732, 2009.

CORSINI, M. D. S.; JORGE, N. Estabilidade oxidativa de óleos vegetais utilizados em frituras de mandioca palito congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p.

27–32, 2006.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, p. 1–25, 2016.

ETAIO, I.; ALBISU, M.; OJEDA, M.; GIL, P. F.; SALMERÓN, J.; PÉREZ ELORTONDO, F. J. Sensory quality control for food certification: A case study on wine. Panel training and qualification, method validation and monitoring. **Food Control**, 21(4), 542–548. 2010.

EVANS, C.D.; LIST, G.R.; MOSER, H.A.; COWAN, J.C. Long term storage of soybean and cottonseed salad oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.50, n.6, p.218-222, 1973.

FABRE, N.; DEHARO, E.; LE, H.L.; GIRARDI, C.; VALENTIN, A.; JULLIAN, G.B.V. LC-ESI-MS/MS analysis of *Quassia amara* leaves tea. Is antiplasmodial activity of the tea is due to quassinoids? **Planta Med.** 78, 1262-1262. 2012.

FARHOOSH, R.; EINAFAHAR, S.; SHARAYEI, P. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. **Food Chemistry**, v. 115, p. 933–938, 2009.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VIUDA-MARTOS, M.; SENDRA, E.; SAYAS-BARBERÁ, E.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 1-2, p. 1–6, 2007.

FERRARI, A. P. **Atividade alelopática, antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico**. 2013. 117f. Dissertação (Mestre em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. O que realmente significa o valor-p? **J Bras Pneumol.**, v. 41, n. 5, p. 3713, 2015.

GARCÍA-BARRANTES, P. M.; BADILLA, B. Anti-ulcerogenic properties of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) standardized extracts in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 904–910, 2011.

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

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HERNANDEZ, A. Q. **Plantas Al Servicio de la salud - Plantas Medicinales de Costa Rica y Centroamerica**. San José, Costa Rica:, 2008.

HOUGH, G.; FISZMAN, S. **Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos**. 1. ed. Val ed. 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Cap. 16 - Óleos E Gorduras. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**, v. 1, p. 593–629, 2008.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated

storage. **Food Chemistry**, v. 100, p. 246–254, 2007.

JAKIEMIU, E. A. R. **UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.)**. [s.l.] Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, 2008.

JEVRIC, L. R. KARADZI, M. Z.; MANDIC, A. I.; KUZMANOVIC, S. O. P.; KOVACEVI, S. Z.; NIKOLIC, A. R.; OKLJESA, A. M.; SAKAC, M. N.; GASI, K. M. P.; STOJANOVIC, S. Z. Lipophilicity estimation and characterization of selected steroid derivatives of biomedical importance applying RP HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 134, p. 27–35, 2017.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R.; ANGELO, P. M.; ANDREO, D. Composição centesimal e atividade antioxidante do extrato de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) em óleo de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, 19 dez. 2009.

KAMKAR, A.; ARDEKANI, M. R. S.; SHARIATIFAR, N.; MISAGI, A.; NEJAD, A. S. M.; JAMSHIDI, A. H. Antioxidative effect of Iranian *Pulicaria gnaphalodes* L. extracts in soybean oil. **South African Journal of Botany**, v. 85, p. 39–43, 2013.

KAMKAR, A. TOORIYAN, F.; JAFARI, M.; BAGHERZADE, M.; SAADATJOU, S.; AGHAEE, E. M. Antioxidant Activity of Methanol and Ethanol Extracts of *Satureja hortensis* L. in Soybean Oil. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 1, p. 113–119, 2014.

KAMRUZZAMAN, M.; ELMASRY, G.; SUN, D. W.; ALLEN, P. Non-destructive assessment of instrumental and sensory tenderness of lamb meat using NIR hyperspectral imaging. **Food Chemistry**, 141(1), 389–396. 2013.

KAWAZOS, L. A. Dossiê Óleos. **Food Ingredients Brasil**, v. 31, p. 38–55, 2014.

KRICHENE, D.; ALLALOUT, A.; MANCEBO-CAMPOS, V.; SALVADOR, M. D.; ZARROUK, M.; FREGAPANE, G. Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. **Food Chemistry**, 121(1), 171–177. 2010.

KUMAZAWA, S.; TANIGUCHI, M.; SUZUKI, Y.; SHIMURA, M.; KWON, M. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 373–377, 2002.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 861–868, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e tecnologia dos Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.

LIMA, V. N.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D.M.; SANTOS, E. S.; MORAIS, L. P.; TINTINO, S. R.; FREITAS, T. S.; GERALDO, Y. S.; PEREIRA, R. L.S.; CRUZ, R. P.; MENEZES, I. R.A.; COUTINHO, H.D.M. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 56–61, 2016.

LOBO, L. T.; SILVA, G. A.; FREITAS, M. C. C.; FILHO, A. P. S. S.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P. Stilbenes from *Deguelia rufescens* var. urucu (Ducke) Leaves: Effects on Seed Germination and Plant Growth. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 10, p. 1838–1844, 2010.

LÓPEZ-AGUILAR, J. R.; VALERIO-ALFARO, G.; MONROY-RIVERA, J. ; MEDINA-JUÁREZ, L.; O'MAHONY, M.; ANGULO, O. Evaluation of a simple and sensitive sensory method for measuring rancidity in soybean oils. **Grasas Y Aceites**, 57(2), 149–154. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Intituto Plantarum, p. 544, 2008.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 58–63, 2009.

MACEDO, E. G.; POTIGUARA, R. C. V.; NETO, O. R. Anatomia Foliar de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), uma espécie medicinal e inseticida. **Ciências Naturais**, v. 1, p. 9–18, 2005.

MAGALHÃES, S. C.Q.; TAVEIRA, M.; CABRITA, A. R.J.; FONSECA, A. J.M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. European marketable grain legume seeds: Further insight into phenolic compounds profiles. **Food Chemistry**. V. 215, p. 177-184, 2017.

MARANHÃO, H. M. L.; VASCONCELOS, C. F. B.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; NETO, J. da C. S.F.; SILVA, R. C. da; FERNANDES, M. P.; COSTA-SILVA, J. H.; ARAÚJO, A. V.; WANDERLEY, A. G. Hepatoprotective Effect of the Aqueous Extract of *Simarouba amara* Aublet (Simaroubaceae) Stem Bark against Carbon Tetrachloride (CCl₄)-Induced Hepatic Damage in Rats. **Molecules**, v. 19, n. November, 2014a.

MARANHÃO, H. M. L.; ROLIM, L. A.; CALDAS, G. F. R.; SILVA-NETO, J. da C. Gastroprotective effects of the aqueous extract of *Simarouba amara* Aublet (simaroubaceae) stem bark on experimentally induced gastric ulcers in rodents. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS)**. V. 4, p. 58-66, 2014b.

MARQUES, L. C. *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) no Tratamento de Urolitíase: Proposta de Documentação para Registro Simplificado como Fitoterápico. **Revista Fitos**, v. 5, p. 20–33, 2010.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N.. Antioxidantes Naturais da família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96–103, 2007.

MEI, W. S. C.; ISMAIL, A.; ESA, N. M.; AKOWUAH, G. A.; WAI, H. C.; SENG, Y. H. The Effectiveness of Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Extract in Stabilization of Sunflower Oil under Accelerated Conditions. **Antioxidants**, v. 3, p. 371–386, 2014.

MELLO, J. R. B. DE; MELLO, F. B. DE; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. December 2008, 2009.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, BRASIL. **Alim. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 537–548,

2012.

MESSIAS, K. L. DA S. Dossie Antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 6, p. 16–31, 2009.

MOHAMMADI, A. ; JAFARI, S. M.; ESFANJANI, A. F.; AKHAVAN, S. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. **Food Chemistry**, v. 190, p. 513–519, 2016.

MOJET, J.; DÜRRSCHMID, K.; DANNER, L.; JÖCHL, M.; HEINIÖ, R.-L.; HOLTHUYSEN, N.; KÖSTER, E. Are implicit emotion measurements evoked by food unrelated to liking? **Food Research International**, 76, 224–232. 2015.

MOREIRA, C. Dossiê Antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 36, p. 31–48, 2016.

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

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUCHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 227–235, 2005.

NOGUEIRA, N. M.; SOARES, B. T. M.; ANDRADE, A. B. N. de; KUMAR, A. S. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada. **Rev. Bras. Farm.**, v. 92, n. 2, p. 44–50, 2011.

NUNOMURA, R. de C. S.; PINTO, A. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M.; AMARAL, A. C. F. Constituintes químicos dos galhos de *Simaba guianensis* subesp. ecaudata (Cronquist). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2153–2158, 2012.

O'KEEFE, S. F.; PIKE, O. A. **Fat Characterization**. 4th ed. ed. New York, NY, USA: Springer Science and Business Media, 2010.

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C., ANDOLFATTO, S., KARLING, M., CALEGARI, M. A., SADO, R. Y., MAIA, F. M. C.; ALENCAR, S. M.; LIMA, V. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26, 2054 e 2062, 2015.

OLIVEIRA, L. S.; THOMÉ, G. R.; LOPES, T. F.; REICHERTA, K. P.; OLIVEIRA, J. S. de; PEREIRA, A. da S.; BALDISSARELI, J.; KREWER, C. da C.; MORSCHA, V. M.; CHITOLINA, M. R.; SPANEVELLO, R. M. Effects of gallic acid on delta – aminolevulinic dehydratase activity and in the biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1291–1299, 2016.

OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1158–1164, 2014.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E. DE; GONÇALVES, L. A. G. Teste de tba aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655–663, 2005.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da

concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; LAMER-ZARAWSKA, E.; SWIADER, K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 579–583, 2007.

OUYANG, Q.; CHEN, Q.; ZHAO, J. Intelligent sensing sensory quality of Chinese rice wine using near infrared spectroscopy and nonlinear tools. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 154, p. 42–46, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à espectroscopia**. 1.ed. São Paulo: Cengage Learning, p. 716, 2010.

PIRES, E. A.; CONCEIÇÃO, E. J.; JÚNIOR, E. O. R.; SILVA, F. G.; BARBOSA, C. A. Mapeamento tecnológico da soja em documentos de patentes e artigos brasileiros entre 1975-2012. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, p. 281–290, 2015.

PITARO, S. P.; FIORANI, L. V.; JORGE, N. Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. 4, p. 686–691, 2012.

PRADO, E. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106f. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.; BARBOSA, L.C.A.; ROCHA, R.P.; BERBERT, P.A. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 1, p. 453–457, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RAMALHO, B. V. C.; JORGE, N. Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. **GRASAS Y ACEITES**, v. 59, n. 2, p. 128–131, 2008.

RAMOS, M. A. M. S. Health beneficial effects of cocoa phenolic compounds: a mini review. **COFS**. V. 198, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biology and Medicinal**, v.26, p.1231-1237, 1999.

RIOS, H. C. S.; PEREIRA, I. R. O.; ABREU, E. S. Avaliação da oxidação de óleos, gorduras e azeites comestíveis em processo de fritura. **Revista Ciência & Saúde**, v. 6, n. 2, p. 118–126, 2013.

ROCHA, N. C. da; ALMEIDA, F. D. L. Efeitos da temperatura e da luminosidade nas características físico-químicas dos óleos de soja e de girassol durante o armazenamento. **Nutrivisa – Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**. v. 1, n. 1, 2014.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L. da; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 26, p. 238–244, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3^o edição revisada. Ed. Carita. Campinas, SP, 2014.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado Técnico 125, **Embrapa Agroindústria Tropical** - Fortaleza, CE, 2006.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; FILHO, J. M.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado Técnico 126. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 1, p. 1–101, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. 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 Agroindústria Tropical** - Fortaleza, CE, 2007.

SICHERI, A. P. M. P. **Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. 2013. 126 f. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba. 2013.

SILVA, A. C. Da; JORGE, N. Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. **J Food Sci Technol**, v. 51, n. June, p. 1208–1212, 2014.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, p.460, 2000.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. **Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils**. 2^a ed ed. 2002.

SOARES, D. J.; TAVARES, T. M.; BRASIL, I. M.; FIGUEIREDO, R. W. De; SOUSA, P. H. M. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **B.CEPPA**, v. 30, p. 263–272, 2012.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; BRANDÃO, M. S.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SUCUPIRA, N. R.; BRAGA, A.; PEREIRA, G.; NASCIMENTO, J. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2012.

TALSMA, P. Assessing sensory panel performance using generalizability theory. **Food Quality and Preference**, 47, 3–9. 2016.

TEIXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 64, p. 12–21, 2009.

VALLI, M.; SANTOS, R. N.; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA C. H.; CASTRO-GAMBOA I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, p. 1–6, 2013.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. AMORA-PRETA (*Rubus* sp.): Otimização do Processo de Extração para Determinação de Compostos Fenólicos Antioxidantes. **Rev. Bras. Frutic.** V. 3, p. 1209-1204, 2011.

WANKENNE, M. A. Os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. **Food Ingredients Brasil**, v. 29, p. 38–45, 2014.

WU, X.; SONG, X.; QIU, Z.; HE, Y. Mapping of TBARS distribution in frozen–thawed pork using NIR hyperspectral imaging. **Meat Science**, v. 113, p. 92–96, 2016.

XING, Y.; ZHANG, L.; SHI, C.; SHANG, Y.; ZHANG, J.; HAN, J.; DONG, J. The extraction, isolation and identification of exudates from the roots of *Flaveria bidentis*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 105-114, 2014.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; LIOW, M. L.; HO, C. W. Antioxidant Potential of *Pleurotus porrigens* Extract and Application in Sunflower Oil during Accelerated Storage. **Chiang Mai J. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 34–48, 2013.

ZHEN-LONG, X.; GUO, C.; GU, J.; LU, W.; LI, X.; XIAO, K. Identification of Organic Substances Associated with Tissue Senescence in Upland Cotton (*Gossypium spp.* L.) Based on GC-MS Analysis. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. August, p. 1197–1205, 2011.