

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEISY ANTUNES DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DA *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.
(MYRTACEAE)**

PATO BRANCO

2023

DEISY ANTUNES DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DA *Campomanesia xanthocarpa* O.
Berg. (MYRTACEAE)**

**Optimization of extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from
Campomanesia xanthocarpa O. Berg. (Myrtaceae) leaves**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

PATO BRANCO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pato Branco
Departamento de Química
Curso de Bacharelado em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

Otimização da extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante das folhas da *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Mirtacea)

por

Deisy Antunes Da Costa

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado(a) em 14 de 06 de 23 às 14 horas como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni
Prof. Orientador

Sirlei Dias Teixeira
Membro titular

Solange Teresinha Carpes
Membro titular

Nota: O Documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo [xxxxx.xxxxxx/xxxx-xx](#) e documento [xxxxxxx](#).

Dedico esta pesquisa aos meus pais
e meus irmãos, que sempre
acreditaram em mim e me
incentivaram a seguir em frente nos
momentos difíceis dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

São poucos parágrafos para expor a minha imensa gratidão a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente nessa caminhada, já antecipo minhas desculpas a aqueles que não fazem parte dessas palavras, mas tenham certeza que estão em meus pensamentos e coração.

Primeiramente agradeço imensamente a toda minha família, especialmente aos meus pais Antonio Antunes da Costa e Cleonir Teresinha Fernandes do Carmo, que sempre me incentivaram e, ainda incentivam, a estudar e fazer ciência, mesmo não entendendo muito bem o que eu faço até hoje. Aos meus irmãos Jakson Fernandes Faedo e Dandara Antunes da Costa, que em meio as nossas besteiras nunca me deixaram desistir, e sempre falaram “Se não for você, vai ser quem?”. É muito reconfortante saber que tenho vocês ao meu lado, mesmo não estando perto.

Aos amigos do peito que a universidade me deu de presente, Larissa Carvalho dos Santos, Julia Griz e Luis Gustavo da Silva, que desde o primeiro mês da graduação estão ao meu lado, incentivando, chorando, festejando, sempre nós, as “Senhoras”.

Ao meu namorado Gabriel Lopes, que sempre me incentivou e apoiou, mesmo estando longe.

A professora Dr^a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, pela orientação, pela confiança cedida, pelos ensinamentos, dedicação e principalmente pela paciência nesse um ano de desespero da minha parte.

Ao professor Dr. Vanderlei Lima, pela ajuda, e incentivo nesses últimos dias. Estendo o agradecimento a todos os professores da COQUI, por todos os ensinamentos, pela amizade construída nesse tempo, com certeza fizeram esses anos passarem de forma mais leve.

A Edenes Loss minha conselheira e amiga, que as vezes escondeu seus problemas para poder me ajudar, ao Everton Pizato, que entre uma piada e outra, sempre me ajudou e aconselhou quando eu precisei.

A todos os funcionários e estagiários da Central de Análises e do Laboratório de Qualidade Agroindustrial – LAQUA, em especial a Gabrieli Vieira, pelo apoio e paciência.

A todos os amigos que fiz nesse tempo, e sempre estiveram ao meu lado quando precisei, com vocês tudo se tornou mais fácil.

A todos o meu muito obrigada.

“Por mais que se tenha feito, muito mais eu alcançarei. Desbravarei novos caminhos, explorarei forças desconhecidas e revelarei ao mundo os mistérios mais profundos da criação.”

Mary Shelley.

RESUMO

A *Campomanesia xanthocarpa*, conhecida como guabirobeira, guavirova, guabiroba-miúda e guabirobeira-do-mato, é uma planta muito comum na região sul, sudeste e centro-oeste do Brasil. Ela produz um fruto laranja muito apreciado pelos indígenas. Suas folhas são utilizadas na medicina popular, na busca de alívios de doenças infecciosas, principalmente infecção urinária, além de estudos preliminares demonstrarem que podem ser utilizadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e oncológicas. Isso se deve a presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Até o momento poucos estudos haviam sido realizados com as folhas da planta, e por esse motivo este trabalho tem como objetivo otimizar o processo de extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Neste estudo, foi realizado um planejamento fatorial 2², onde as variáveis dependentes foram o teor de fenólicos totais, e a atividade antioxidante avaliada pelo método da captura do radical DPPH, e pela redução do ferro (FRAP), enquanto as variáveis independentes que foram avaliadas no processo de extração foram o tempo de extração em banho de ultrassom e a proporção dos solventes etanol:água. A atividade antioxidante das folhas variou de 169,52 a 682,55 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ pelo método de captura do radical DPPH e 649,85 a 1386,79 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ pela redução do ferro. O teor de fenólicos totais apresentou uma variação de 14,96 a 57,02 mg EAG g^{-1} (EAG: Equivalente em ácido gálico). Desta forma, foi possível definir a melhor condição de extração que foi o nível inferior de concentração de etanol (20%) sem a influência do tempo de extração. Após isso, os extratos que apresentaram a menor e maior atividade antioxidante foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) para a identificação e quantificação de compostos fenólicos. A partir a interpretação dos cromatogramas foram identificados os compostos: ácido gálico, catequina, rutina, isoquercetina e astragalina.

Palavras-chave: Produtos naturais; Bioatividade; Planejamento fatorial; DPPH; FRAP; CLAE.

ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa, known as guabirobeira, guavirova, guabiroba-miúda, and guabirobeira-do-mato, is a very common plant in the southern, southeastern, and central-west regions of Brazil. It produces a highly appreciated orange fruit by indigenous people. Its leaves are used in folk medicine to seek relief from infectious diseases, particularly urinary tract infections, and preliminary studies have shown that they can be used for the treatment of neurodegenerative, cardiovascular, and oncological diseases. This is due to the presence of phenolic compounds with antioxidant activity. So far, few studies have been conducted on the plant's leaves, and for this reason, this work aims to optimize the process of extracting phenolic compounds with antioxidant activity. In this study, a 2² factorial design was performed, where the dependent variables were the total phenolic content and the antioxidant activity evaluated by the DPPH radical scavenging method and the ferric reducing antioxidant power (FRAP), while the independent variables evaluated in the extraction process were time and the ethanol:water ratio. The antioxidant activity of the leaves ranged from 169.52 to 682.55 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ by the DPPH radical scavenging method and from 649.85 to 1386.79 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ by the ferric reduction method. The total phenolic content showed a variation from 14.96 to 57.02 mg GAE g^{-1} (GAE: Gallic Acid Equivalent). Thus, it was possible to define the best extraction condition, which was the lower level of ethanol concentration (20%). Afterward, the extracts with the lowest and highest antioxidant activity were injected into the high-performance liquid chromatograph (HPLC) for the identification and quantification of compounds within the plant's complex matrix, revealing the presence of gallic acid, catechin, rutin, isoquercetin, and astragaline.

Keywords: Natural products; Bioactivity; Factorial design; DPPH; FRAP; HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Locais onde a <i>Campomanesia xanthocarpa</i> é encontrada no Brasil.....	18
Figura 2 - Frutas e folhas da <i>Campomanesia xanthocarpa</i> comparado a uma régua. ...	19
Figura 3 - Frutas e folhas da <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	19
Figura 4 - Estrutura geral dos fenóis simples.....	20
Figura 5 - Estrutura geral da classe dos flavonoides, composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).....	21
Figura 6 - Estruturas de alguns antioxidantes naturais da classe dos não flavonoides..	21
Figura 7 - Reação entre ácido gálico com molibdênio VI, levando à formação de molibdênio V.....	23
Figura 8 - Reação de uma amina aromática com o molibdênio VI, levando a formação do molibdênio V.....	23
Figura 9 - Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante genérico.....	24
Figura 10 - Reação de oxirredução envolvida no ensaio de FRAP.....	24
Figura 11 - Gradiente dos solventes.....	29
Figura 12 - Foto dos extratos resultantes da extração segundo o planejamento fatorial.....	30
Figura 13 - Diagrama de Pareto para a análise de RFC.....	32
Figura 14 - Diagrama de Pareto para DPPH (a) e FRAP (b).....	33
Figura 15 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de RFC.....	35
Figura 16 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de DPPH.....	36
Figura 17 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de FRAP.....	36
Figura 18 - Superfície de resposta em 3D (a) e 2D (b) da influência da concentração de etanol e tempo para RFC.....	37
Figura 19 - Superfície de resposta em 3D (a) e 2D (b) da influência da concentração de etanol e tempo para DPPH.....	37
Figura 20 - Superfície de resposta em 3D (a) e 2D (b) da influência da concentração de etanol e tempo para FRAP.....	38
Figura 21 - Estrutura ácido gálico (a); catequina (b); rutina (c); isoquercetina (d) e astragalina (e).....	40
Figura 22 - Cromatograma do mix de padrões, (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogênico, (4) ácido vanílico, (5) ácido cafeico, (6) epicatequina, (7) ácido ferrúlico, (8) ácido cumárico, (9) rutina, (10) isoquercetina, (11) astragalina, (12) quercetina, (13) ácido cinâmico, (14) canferol injetados na concentração 20 mg L ⁻¹ e obtidos em 280 nm... ..	41
Figura 23 - Cromatograma do extrato com menor atividade antioxidante (C2), apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) rutina, (4) isoquercetina e (5) astragalina.....	42

Figura 24 – Cromatograma do extrato com maior atividade antioxidante (C5), apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) rutina, (4) isoquercetina e (5) astragalina..... 42

Figura 25 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos com maior (C5) e menor (C2) atividade antioxidante, apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) rutina, (4) isoquercetina e (5) astragalina. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento experimental.	27
Tabela 2 - Resultado do planejamento fatorial para o processo de extração.....	31
Tabela 3 - Tabela de efeito para o teor de fenólicos totais.	32
Tabela 4 - Tabela de efeito para DPPH e FRAP.	33
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão dos modelos, valor de R ² e valor F.	34
Tabela 6 – Tempo de retenção (T.R.), banda de absorção; equação de regressão; coeficiente de determinação (R ²) e quantificação de cada composto.	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1. Produtos naturais	17
3.2. Campomanesia xanthocarpa O. Berg	17
3.3. Compostos fenólicos	20
3.4. Antioxidantes	22
3.5. Método de redução da capacidade do reagente Folin-Ciocalteu	22
3.6. Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)	23
3.7. Método da redução do ferro – FRAP	24
3.8. Otimização das condições de extração	25
3.9. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	26
4. MATERIAL DE MÉTODOS	26
4.1. Material vegetal	26
4.2. Planejamento experimental	27
4.3. Determinação da atividade antioxidante	28
4.3.1. Método da redução da capacidade do reagente Folin-Ciocalteu	28
4.3.2. Sequestro do radical DPPH	28
4.3.3. Método da redução do ferro – FRAP	28
4.4. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Planejamento Experimental	30
5.2. Teor de fenólicos totais	38
5.3. Avaliação da atividade antioxidante	39
5.4. Identificação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	39
6. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pelo homem desde a antiguidade para a cura de doenças e males do corpo. Muitas culturas utilizaram estes produtos por serem a principal, ou única matéria prima para a elaboração de medicamentos. Os indígenas do Brasil são exemplos de povos que fazem o uso de plantas para a cura de doenças e para a produção de pigmentos naturais, sendo utilizado nas pinturas corporais tão conhecidas da sua cultura.

Os produtos naturais têm grande visibilidade e importância, pois eles são uma fonte de compostos bioativos usados no desenvolvimento de novas drogas, permitindo o avanço na descoberta de agentes terapêuticos contra doenças infecciosas, neurodegenerativas, imunodeficiências entre outras. Desta forma, a identificação de novos compostos bioativos, assim como, os mecanismos de ação tornam-se desafios dos pesquisadores da área de produtos naturais.

A *Campomanesia xanthocarpa*, conhecida popularmente como guabiroba, ou guavirova, é uma árvore nativa brasileira que pertence à família Myrtaceae. É encontrada majoritariamente na região sul e sudeste do Brasil, mas também pode ser encontrada no Paraguai e Argentina. Sua fruta é comestível e saborosa, apreciada principalmente pelos povos indígenas, pode ser consumida *in natura*, em sorvetes, licores e sucos. A infusão das folhas é utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias, reumáticas, obesidade, tem efeito depurativo, antidiarreico e auxilia na redução dos níveis de colesterol sanguíneo (BIAVATTI *et al.*, 2004; SANT'ANNA *et al.*, 2017).

A família Myrtaceae é conhecida no meio científico por apresentar compostos fenólicos e compostos com atividade antioxidante. Trabalhos na literatura indicam que as frutas, folhas e sementes da *C. xanthocarpa*, possuem compostos fenólicos com atividade antioxidante (SANT'ANNA *et al.*, 2017; CATELAN *et al.*, 2019; KATAOKA; CARDOSO, 2013; SILVA, *et al.*, 2016; CAPELETO, 2015; PEREIRA *et al.*, 2012).

Os compostos com capacidade antioxidante, principalmente os compostos fenólicos, proporcionam muitos benefícios a saúde humana, pois reduzem o processo oxidativo sequestrando os radicais livres e prevenindo o surgimento de diversas doenças.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho será otimizar a extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir das folhas da *C. xanthocarpa* utilizando planejamento fatorial e análise da superfície de resposta, além de identificar e quantificar

os compostos fenólicos presentes nos extratos de maior e menor capacidade antioxidante utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Otimizar a extração e identificação de compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir das folhas de *C. xanthocarpa* utilizando planejamento fatorial e superfície de resposta.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Produzir o extrato hidroalcólico das folhas da *C. xanthocarpa* em banho de ultrassom, variando a proporção dos solventes etanol e água e o tempo de extração;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos por meio dos métodos de redução do ferro – FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power) e do reagente Folin-Ciocalteu (CFT) e pelo sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).
- ✓ Otimizar o método de extração por meio de planejamento fatorial e análise da superfície de resposta.
- ✓ Identificar e quantificar via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), os compostos fenólicos presentes nas folhas da *C. xanthocarpa*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Produtos naturais

Os produtos naturais são utilizados pelo homem desde a antiguidade, buscando o alívio ou a cura de doenças, sendo as vezes a como única base terapêutica disponível. A ingestão de ervas, raízes, e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas da utilização dos produtos naturais para o tratamento de doenças. A história do desenvolvimento de civilizações do mundo todo é repleta de exemplos sobre a utilização de plantas na medicina e no controle de pragas. Como as técnicas desenvolvidas pelos egípcios para a conservação de múmias, tais técnicas até hoje ainda são um desafio para a Química Moderna (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Além de técnicas utilizadas na medicina na Idade Antiga, muitos venenos foram descobertos e usados para defesa, caça, e ilícitos, como o Veneno de Helmlock, que é feito a partir da cicuta, *Conium maculatum*, era usado para executar os prisioneiros durante o Império Grego, inclusive Sócrates foi executado com esse veneno (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. São quase 47000 espécies vegetais nativas conhecidas, distribuídas entre os seis biomas terrestres (Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal) e os três ecossistemas marinhos (oceano, lago e rios). Destaca-se que dentre a vasta flora, aproximadamente 55% das plantas terrestres são endêmicas. Essa variedade de vida soma mais de 20% do total de espécies do mundo, que é favorecido pela diversidade no clima, já que o Brasil é um país grande, que ocupa quase metade da América do Sul (GOV.BR, 2022; IBGE EDUCA, 2022; SOARES *et al.*, 2020).

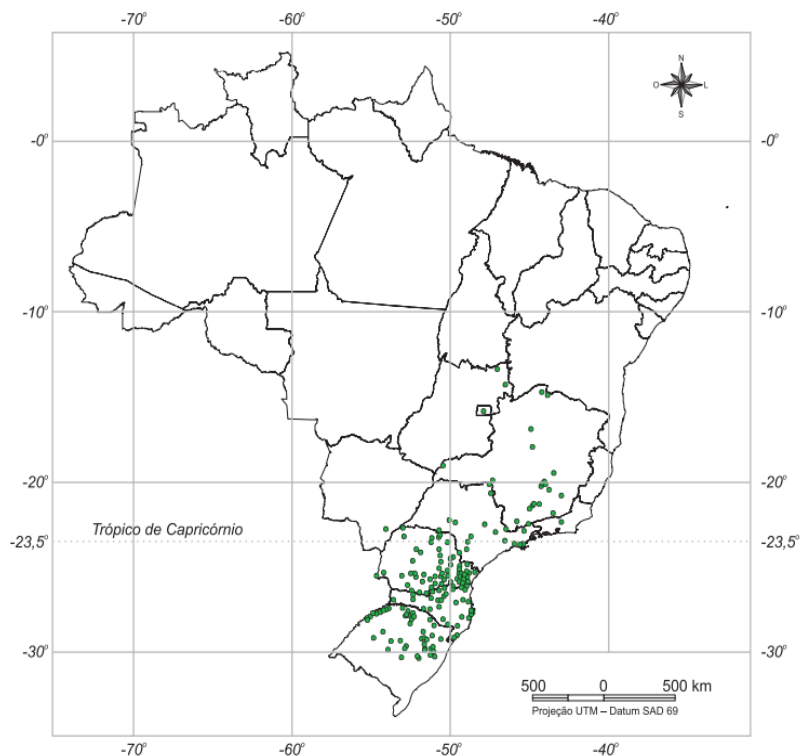
Entretanto a biodiversidade brasileira é pouco conhecida e ainda pouco valorizada. Estima-se que a população usa menos de 30 espécies vegetais em sua alimentação. A rica flora brasileira não está refletida nos pratos da população e as farmácias estão carentes de produtos oriundos da flora nativa (CORADIN; CAMILLO, 2016). Mesmo com a rica biodiversidade do país apenas cerca de 1% das espécies da flora nativa foram pesquisadas em busca de compostos bioativos (MESSIAS *et al.*, 2015).

3.2. *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg

A *C. xanthocarpa*, é uma árvore frutífera lenhosa que pertence à Myrtaceae e representa uma das 5500 espécies distribuídas em mais de 132 gêneros desta família. É nativa do Brasil e conhecida popularmente como guabirobeira, guavirova, guabiroba-

miúda e guabirobeira-do-mato. Esta árvore está distribuída no sul, centro-oeste e sudeste do Brasil (Figura 1), no entanto, pode também ser encontrada no Paraguai e Argentina (VALLILO, 2008; OLIVEIRA, 2018).

Figura 1 - Locais onde a *Campomanesia xanthocarpa* é encontrada no Brasil.



Fonte: (CARVALHO, 2006).

A árvore pode atingir até 25 metros de altura, seu tronco é acanalado com sapopemas na base e com rugosidade macia. Sua copa é arredondada e densa, com folhas simples oval-oblongas, isso quer dizer que são cerca de duas vezes mais longas e com as bordas relativamente paralelas, de cor verde lustrosa (Figura 2), medindo de 5 a 12,5 cm de comprimento por 2 a 7 cm de largura. As flores podem ocorrer de forma isoladas ou grupais, brancas, vistosas com cinco pétalas, axilares, hermafroditas, mas com pouca durabilidade, 1 a 4 dias. As suas frutas são globosas, coroadas de sépalas, possuem coloração verde quando imaturo, e amarelo ou alaranjado quando maduro (Figura 3). São comestíveis e com uma polpa succulenta de sabor doce, sendo muito apreciados pelo homem, principalmente indígenas. Dentro das frutas contêm de 5 a 12 sementes castanhas

ovais achatadas (CARVALHO, 2006; SANTOS, 2013; HOMCZINSKI *et al.*, 2017; SIDOL, 2012).

Figura 2 - Frutas e folhas da *Campomanesia xanthocarpa* comparado a uma régua.



Fonte: (VIVEIRO CIPREST – PLANTAS NATIVAS E EXÓTICAS, 2017)

Figura 3 - Frutas e folhas da *Campomanesia xanthocarpa*.



Fonte: (VIVEIRO CIPREST – PLANTAS NATIVAS E EXÓTICAS, 2017)

Os frutos podem ser consumidos *in natura*, ou usados para fazer sucos, licores ou doces (BIAVATTI *et al.*, 2004). Além de seu uso na área alimentícia, o chá feito a partir da infusão das folhas da guabirobeira é utilizado na medicina popular, no tratamento de doenças inflamatórias, e reumáticas, urinárias, obesidade, tem efeito depurativo, anti-diarreico, e usado para diminuir o colesterol (BIAVATTI *et al.*, 2004; SANT'ANNA *et al.*, 2017).

Além do uso popular da planta para o tratamento de doenças infecciosas, alguns estudos fitoquímicos mostram que podem ser utilizadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, oncológicas (MACEDO *et al.*, 2022). Entretanto ainda há poucos estudos em relação a extração de compostos bioativos das folhas da *C. xanthocarpa* reforçando a importância do incentivo a pesquisa sobre a planta.

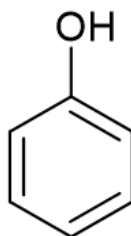
As atividades terapêuticas das plantas do gênero *Campomanesia* são atribuídas aos compostos flavonoides e fenólicos, que possuem alto poder antioxidante. Os compostos fenólicos ácido gálico, quercetina e ácido clorogênico possuem usos em analgésicos, antidiabéticos, anti-inflamatórios, antiobesidade, antioxidante, cardioprotetores, hipotensores e neuroprotetores, e estes compostos já foram identificados em estudos com plantas da família Myrtaceae (SALVADOR *et al.*, 2011; SANT'ANNA *et al.*, 2017, BIAVATTI *et al.*, 2004).

3.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, são produtos especializados do metabolismo vegetal e possuem funções variadas, e principalmente são essenciais para a pigmentação, proteção UV, crescimento, reprodução e resistência das plantas, assim, os compostos fenólicos estão presentes de forma abundante na natureza (GIOXARI *et al.*, 2016).

Os polifenóis são estruturas químicas que apresentam anéis aromáticos e hidroxilas, na forma simples ou de polímeros (GALLICE, 2010) sendo as principais classes os fenóis simples (Figura 5), ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas e taninos (KELLY; KELLY; O'MAHONY, 2018).

Figura 4 - Estrutura geral dos fenóis simples.

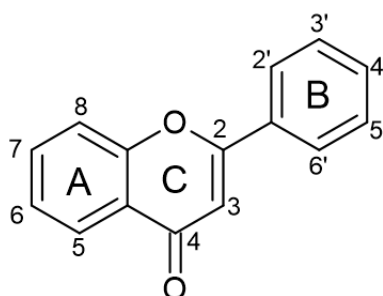


Fonte: Autoria própria.

Os compostos fenólicos se dividem em duas classes, os flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides apresentam estrutura química C₆-C₃-C₆ (Figura 6), e apresentam mais de 4000 espécies já identificadas. Os classificados como não

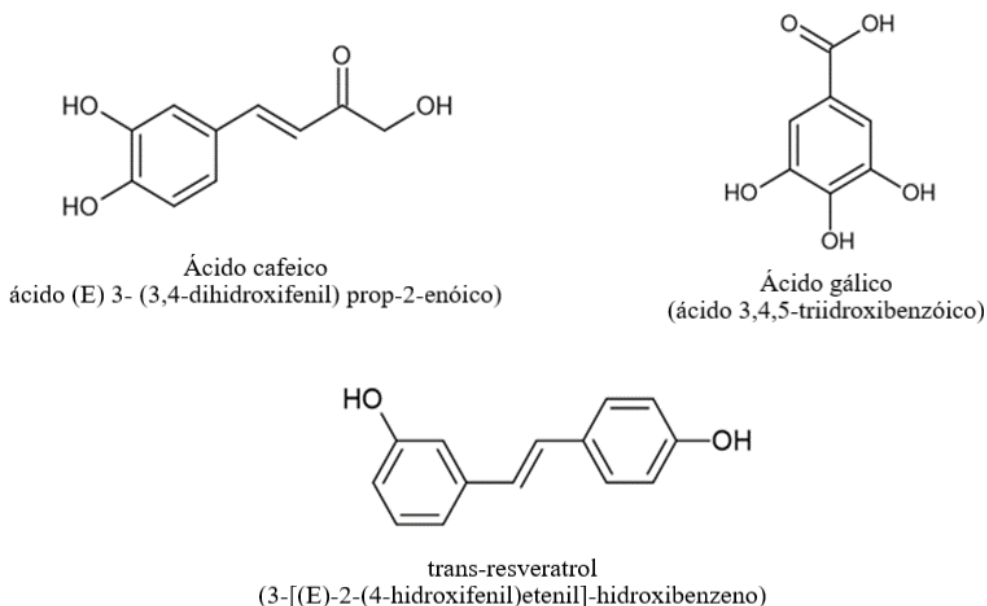
flavonoides, podem ser divididos em 3 classes: os derivados da estrutura química C₆-C₃, assim como o ácido cafeico (Figura 7), os hidroxinamatos; os derivados de C₆-C₁, como o ácido hidroxibenzóico, o ácido elágico e o ácido gálico (Figura 7) e por fim os derivados da estrutura química C₆-C₂-C₂-C₆, como o *trans*-resveratrol (Figura 7), o *trans*-resveratrol-glucosídeo e o *cis*-resveratrol (GALLICE, 2010; SHARMA e JANMEDA, 2017).

Figura 5 - Estrutura geral da classe dos flavonoides, composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Estruturas de alguns antioxidantes naturais da classe dos não flavonoides.



Fonte: Autoria própria.

Estudos já demonstraram que doenças como câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas estão relacionadas aos radicais livres, e como os compostos fenólicos possuem alto potencial redox, são importantes antioxidantes com capacidade de atuar

como hidrogênio doador, agente redutor e inibidor de oxigênio singlete, (KELLY; KELLY; O'MAHONY, 2018; KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA, 2011) tornando-se um grande aliado na busca de novos compostos bioativos na luta contra essas doenças.

3.4. Antioxidantes

O termo antioxidante pode ser definido de várias maneiras. Geralmente, este fica restrito a inibidores de quebra de cadeia peroxidação lipídica. No entanto a palavra antioxidante foi definida genericamente como qualquer substância que, seja estável o suficiente para doar um elétron a um radical livre (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) reduzindo, atrasando ou prevenindo significativamente a oxidação deste (HALLIWEL, 1995; LOBO *et al.*, 2010).

Um método ótimo para avaliar a atividade antioxidante de determinado composto deve ser rápido, reprodutível, barato e não ser influenciado pelas propriedades físicas do composto. (OLDONI, 2010). Pelos diversos tipos de radicais livres e suas atuações no organismo, dificilmente existirá um método universal e simples que possa medir precisamente a atividade antioxidante. Existem vários métodos para avaliar e quantificar a atividade antioxidante *in vitro* de compostos bioativos. Estes testes têm se tornado ferramentas de grande importância na seleção inicial de substâncias com potencial farmacológico, auxiliando na avaliação da atividade de substâncias isoladas de fontes naturais, assim como as obtidas de sinteticamente ALVES *et al.*, 2010).

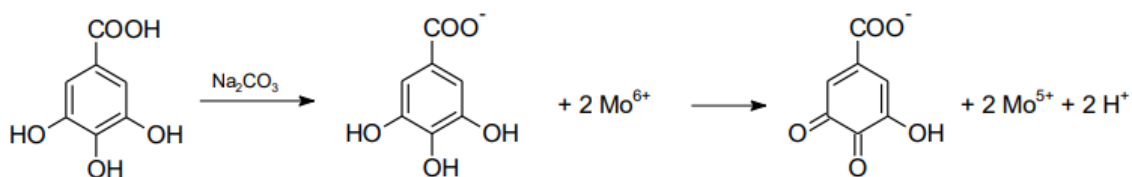
Os métodos mais utilizados na avaliação da atividade antioxidante de plantas sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), método da redução do ferro – FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*, e o método de redução da capacidade do reagente Folin-Ciocalteu.

3.5. Método de redução da capacidade do reagente Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu é utilizado para medir o teor de fenólicos totais em produtos naturais há anos. Foi desenvolvido por Singleton (1974) e é baseado na reação dos fenóis naturais com o reagente de Folin-Ciocalteu, que é uma mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio, onde o molibdênio se encontra no estado de oxidação VI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e possui uma cor característica amarela, entretanto, quando em presença agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os complexos de molibdênio-tungstênio azuis ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_4$)⁴⁻ (Figura 8), que pode ser quantificado por

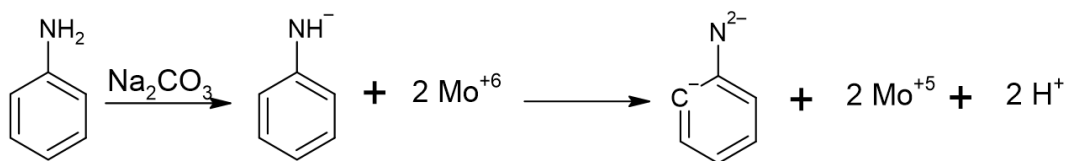
espectrofotometria na região do visível. A reação de desprotonação dos compostos fenólicos acontece em meio básico, produzindo ânions fenolatos. A desvantagem desse método é que as substâncias como vitamina C, aminas aromáticas e açúcares podem interferir na análise, devido a desprotonação dessas substâncias em meio básico, formando o íon fenolato, que irá reagir com o reagente Folin-Ciocalteu e interferir na análise (Figura 9). (HALLWEL; GUTERIDGE; CROSS, 1992 apud OLIVEIRA, 2011).

Figura 7 - Reação entre ácido gálico com molibdênio VI, levando à formação de molibdênio V.



Fonte: (OLIVEIRA, 2011).

Figura 8 - Reação de uma amina aromática com o molibdênio VI, levando a formação do molibdênio V.



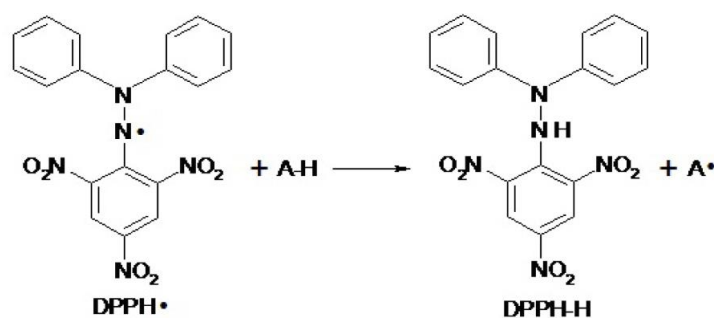
Fonte: Autoria própria.

3.6. Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O método DPPH é popular no estudo de antioxidantes de origem natural, esta análise é considerada simples, precisa, rápida, altamente sensível e econômica, pois precisa apenas do radical e o antioxidante. Este método foi desenvolvido por Blois (1958), para determinar a atividade antioxidante de diversas substâncias utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil.

O DPPH• é um radical livre estável, que apresenta um elétron desemparelhado. Em solução alcoólica ele apresenta coloração púrpura, com uma banda de absorção em 517 nm. Após a sua estabilização com o antioxidante (Figura 9) a solução apresenta descoloração, indo para um amarelo pálido, impedindo a absorção característica em 517 nm (BLOIS, 1958).

Figura 9 - Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante genérico.



Fonte: (OLIVEIRA, 2014).

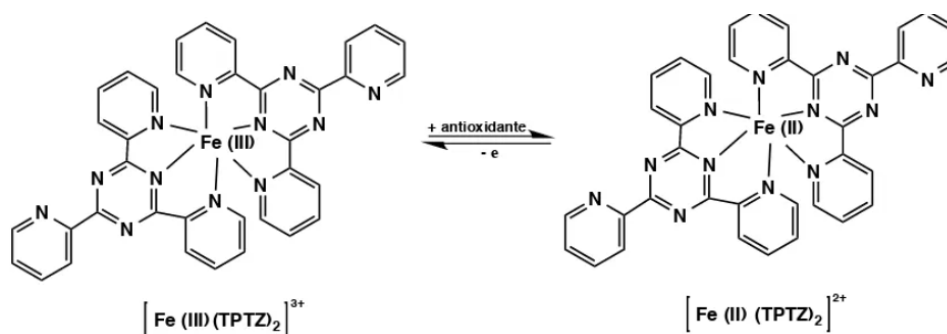
Os resultados do ensaio podem ser expressos em μmol de equivalentes do padrão utilizado no processo (por exemplo Trolox) ou como EC50, que é a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do DPPH• em 50% (MOON; SHIBAMOTO, 2009; ATMANI *et al.*, 2008).

3.7. Método da redução do ferro – FRAP

O método redução do íon ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi desenvolvido por Benzie e Strain (1996), com o intuito inicial de quantificar o ácido ascórbico em soro ou plasma. Este ensaio oferece resultados rápidos, reprodutíveis, e é baseado na redução complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ) a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} - TPTZ) (Figura 10) em meio ácido pelas substâncias antioxidantes, apresentando variação na intensidade da cor, de azul claro para azul intenso que tem uma absorção máxima e 593 nm (APAK *et al.*, 2004).

A desvantagem desse ensaio é que a curva padrão deve ser feita com um antioxidante solúvel em água, assim como o ácido ascórbico e o Trolox, e normalmente este método não é sensível a todos os antioxidantes presentes na matriz complexa, porém ele é amplamente usado em estudos sobre plantas e alimentos associado a outros ensaios (APAK *et al.*, 2004).

Figura 10 - Reação de oxirredução envolvida no ensaio de FRAP.



Fonte: (LEÓN; ALEXANDRA, 2015).

3.8. Otimização das condições de extração

A busca por compostos bioativos naturais com potencial para o tratamento de doenças e atender outras necessidades humanas é um tema chave em muitos laboratórios pelo mundo, porém os processos de extração destes compostos não são universais, ou seja, não podem ser usados em todos os tipos de plantas, e para cada nova espécie pesquisada um novo método deve ser utilizado (GIL-CHAVEZ *et al.*, 2012; JOVANOVIC *et al.*, 2017).

As técnicas de extração tradicionais mais usadas são a maceração, extração por calor, extração por percolação, digestão e extração por Soxhlet, já atualmente tem se usado muito ultrassom, micro-ondas, fluido supercrítico, e extração acelerada por solventes. As técnicas tradicionais são conhecidas por serem longas e utilizarem muito solvente e material vegetal, já as técnicas mais atuais possuem maior rendimento de polifenóis além de serem mais rápidos e econômicos, impactando menos o meio ambiente (JOVANOVIC *et al.*, 2017; KAUFMANN;CHRISTEN, 2001).

Encontra-se na literatura vários trabalhos utilizando solventes na extração de compostos bioativos das folhas da *C. xanthocarpa*, como etanol (CATELAN *et al.*, 2019), etanol:água (KATAOKA; CARDOSO, 2013; SILVA, *et al.*, 2016) e água (SANT'ANNA *et al.*, 2017; KATAOKA; CARDOSO, 2013). Entretanto, de acordo com Galanakis *et al.* (2012), para ocorrer uma maior extração de compostos bioativos a presença de água na solução alcoólica durante a extração faz com que a planta absorva a água e expanda, facilitando a entrada e interação do etanol com a matriz sólida.

Entretanto como já dito, os métodos não são universais, assim como a proporção água:etanol para cada planta. Então para encontrar um novo método ótimo, usa-se de recursos estatísticos como o planejamento fatorial e a metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O planejamento fatorial consiste em combinações de duas ou mais variáveis independentes. Se está presente combinações entre todas as variáveis o esquema fatorial é dito como completo, em outros casos é incompleto. Para K variáveis, para N níveis, denota-se um esquema fatorial N^K , se o experimento for de 2 níveis apenas tem-se o chamado planejamento fatorial 2^K . A lista de combinações fornecida pelo esquema fatorial é chamada de matriz de planejamento, quando se adiciona duplicatas, triplicatas etc. aos experimentos, pode-se estimar o erro experimental a uma resposta individual, que é de extrema importância a verificação da existência ou não de efeitos significativos das variáveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; RODRIGUES; LEMMA, 2009).

O método utilizado para ajudar na interpretação de todos os dados gerados pelo planejamento fatorial é a metodologia de superfícies de resposta. Esse método tem duas etapas, a modelagem e o deslocamento, que podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias, até atingir a região ótima da superfície. Na modelagem as respostas obtidas através do planejamento fatorial são ajustadas aos modelos simples, normalmente lineares ou quadráticos. Já o deslocamento sempre se dá ao longo do caminho mais inclinado do modelo, que evidencia a trajetória na qual a resposta variou de forma mais notável (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

3.9. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A cromatografia é uma técnica muito utilizada, na separação, identificação e determinação de substâncias químicas complexas, que se baseia no princípio de que as moléculas de uma mistura, quando em contato com uma fase estacionária fluida, se separam enquanto se movem pela coluna com o auxílio de uma fase móvel. Existem diversos fatores que afetam a separação de substâncias, como por exemplo suas propriedades moleculares que estão relacionadas à adsorção, partição e afinidade, ou ainda as diferenças em seus pesos moleculares (SIMOMUKAY; FERRARI; PEREIRA; et al., 2022; SKOOG, *et al.*, 2015).

Os motivos dessa técnica ser a mais utilizada são a sua alta sensibilidade, fácil adaptação a determinações quantitativas, sua ampla aplicabilidade a substâncias de alto interesse industrial e científico, a sua adequação a espécies termicamente sensíveis e a não voláteis (SKOOG, *et al.*, 2015).

Utilizando esta técnica os principais ácidos fenólicos e compostos que possuem atividade antioxidante, podem ser identificados e quantificados, fazendo a comparação do tempo de retenção e o a forma que o composto absorve a radiação UV-Vis, com os padrões.

4. MATERIAL DE MÉTODOS

4.1. Material vegetal

As folhas da *C. xanthocarpa* foram coletadas no campus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco (coordenadas geográficas: 26°11'49.7"S e 52°41'28.8"O). Após a coleta as folhas foram higienizadas, separadas, secas em estufa com circulação de ar a 40°C, moídas e armazenadas sob refrigeração.

4.2. Planejamento experimental

Para determinar a condição ideal de extração de compostos bioativos das folhas da *C. xanthocarpa*, realizou-se um planejamento fatorial 2^2 onde foram testadas a influência de algumas variáveis na extração. A extração foi realizada utilizando banho de ultrassom e as variáveis independentes escolhidas foram tempo de extração (X_1) e concentração de etanol (X_2) (v/v). Já as variáveis dependentes foram o teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical DPPH e redução do ferro (FRAP), esses métodos são muito utilizados na determinação do potencial antioxidante de plantas, justificando a escolha dos mesmos para o trabalho.

A Tabela 1 apresenta os níveis reais e os níveis codificados que foram utilizados no planejamento fatorial. O valor -1 representa o nível inferior, 0 o ponto central e +1 o nível superior. O planejamento foi composto por um total de 15 ensaios, considerando as diferentes combinações e replicatas.

Tabela 1 - Planejamento experimental.

Ensaio	Tempo (X_1) (min)	Etanol (X_2) (%)
1	5 (-1)	20 (-1)
2	5 (-1)	20 (-1)
3	5 (-1)	20 (-1)
4	5 (-1)	80 (+1)
5	5 (-1)	80 (+1)
6	5 (-1)	80 (+1)
7	15 (+1)	20 (-1)
8	15 (+1)	20 (-1)
9	15 (+1)	20 (-1)
10	15 (+1)	80 (+1)
11	15 (+1)	80 (+1)
12	15 (+1)	80 (+1)
13	10 (0)	50 (0)
14	10 (0)	50 (0)
15	10 (0)	50 (0)

Fonte: A autoria própria.

Os extratos foram preparados a partir de 2 g do material seco e triturado (Item 4.1), adicionando 25 mL da mistura etanol:água (v/v) nas diferentes concentrações citadas na Tabela 1. As misturas foram deixadas em banho de ultrassom em cuba ultrassônica da marca GNATUS, modelo D700, pelos tempos já estabelecidos no planejamento experimental (Tabela 1) em temperatura constante 40°C. Em seguida filtrou-se e armazenou-se os extratos sob refrigeração até o momento das análises.

4.3. Determinação da atividade antioxidante

4.3.1. Método da capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu (RFC)

Adicionou-se uma alíquota de 0,5 mL da amostra previamente diluída 50x, e 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%. Após 5 minutos de repouso, foi adicionado 2,0 mL de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 4%. As soluções ficaram ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, após 2 horas de reação foram realizadas as leituras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 740 nm.

O ácido gálico foi utilizado como padrão de referência, e a curva de calibração foi construída entre 5 a 100 mg L^{-1} . Os resultados foram expressos em mg equivalente ao ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g^{-1}).

4.3.2. Sequestro do radical DPPH

Adicionou-se 0,5 mL das amostras diluídas 500x previamente em tubos de ensaio, em seguida 3,0 mL de etanol e 0,3 mL do radical DPPH (em solução etanólica, 0,5 mmol L^{-1}) foram adicionados. Após 45 minutos de reação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

Utilizou-se como padrão o antioxidante Trolox, e a curva de calibração foi construída entre 15 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do padrão, que em seguida foi feito um gráfico de calibração. Os resultados foram expressos em μmol de Trolox por grama de amostra. A curva auxiliou na determinação da capacidade antioxidante das amostras por esse método.

4.3.3. Método da redução do ferro – FRAP

O reagente FRAP foi preparado a partir de 25 mL de solução tampão acetato (300 mmol L^{-1} , pH 3,6), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mmol L^{-1} em 40 mmol L^{-1} de ácido clorídrico) e 2,5 mL de cloreto de ferro (20 mmol L^{-1}) em solução aquosa.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 100 μL da amostra, diluída 100x, e 3,0 mL do reagente FRAP e foram deixados sob abrigo da luz, em banho maria a 37°C por 30

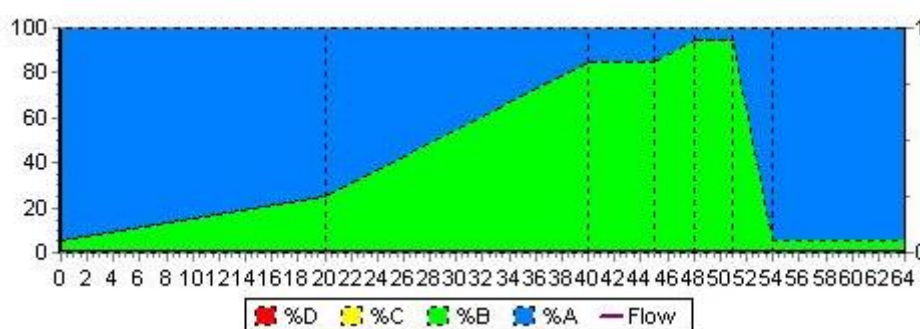
minutos. Em seguida em espectrofotômetro leu-se em absorvância de 595 nm. A curva de calibração foi construída utilizando o sulfato ferroso de 200 a 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e os resultados foram expressos em μmol de Fe^{2+} por grama de planta.

4.4. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Para determinar a quantidade total de compostos fenólicos em uma amostra, foram utilizados padrões para identificar e quantificar a presença de compostos fenólicos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os padrões incluíam ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido cumárico, epicatequina, rutina, isoquercetina, astragalina, ácido cinâmico, quercetina e canferol.

Para a identificação dos compostos fenólicos, foi utilizado um sistema CLAE, coluna C18 de fase reversa, detector com arranjo de fotodiodos e fase móvel constituída por 2% de ácido acético em água pura (solvente A) e 2% de ácido acético, 40% de acetonitrila em água pura (solvente B) em modo gradiente a uma constante 1 mL min^{-1} . Com início de 5% solvente B, após 20 min 25%, com 40 min 85%, e permaneceu constante em 95% de 45 a 51 min, após isso 5% de 54 a 64 min (Figura 11). A coluna permaneceu em temperatura constante de 30 °C. Os extratos foram injetados e os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção e absorção característica dos padrões na região ultravioleta. A metodologia utilizada neste estudo foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa liderado pela Prof. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

Figura 11 - Gradiente dos solventes.



Fonte: Autoria própria.

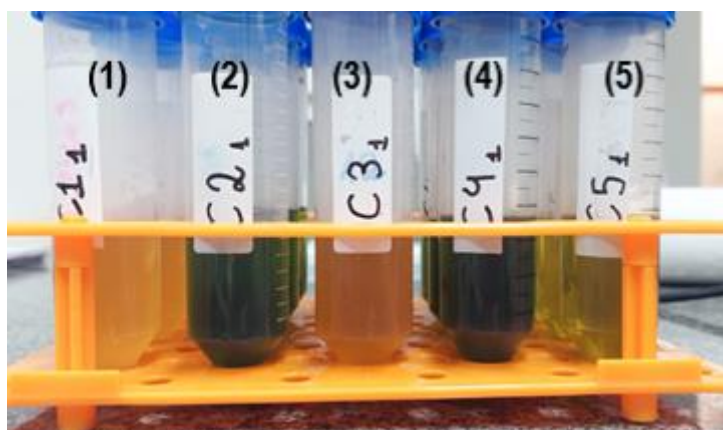
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Planejamento Experimental

O planejamento experimental, foi desenvolvido com o intuito de verificar se as variáveis tempo (X_1) e concentração de etanol (X_2) influenciavam significativamente no processo de extração de compostos bioativos da *C. xanthocarpa*. Foi possível observar que as diferentes condições de extração influenciaram na cor final dos extratos (Figura 12), o que pode significar diferença na composição química.

Durante o processo de extração pôde-se concluir que o fator que influenciou significativamente na diferença de coloração foi a concentração de etanol mais elevada. Devido a coloração mais intensa (Figura 12 – extratos C2 (2) e C4 (4)), inicialmente acreditou-se que os extratos com maior concentração de etanol seriam os que teriam maior número de compostos bioativos e em maior concentração.

Figura 12 - Foto dos extratos resultantes da extração segundo o planejamento fatorial.



Fonte: Autoria própria.

A influência das variáveis foi avaliada por meio das análises da atividade antioxidante pelos métodos de redução do reagente Folin-Ciocalteu (Z_1), redução do ferro (FRAP) (Z_3) e sequestro do radical DPPH (Z_2) (Tabela 2). É possível verificar que o ensaio que apresentou os maiores valores para as variáveis testadas, foi o com a combinação do tempo intermediário (10 min) e concentração de etanol intermediário (50%), ensaio 13. Enquanto o que apresentou menor atividade antioxidante foi o ensaio 4, com nível superior de concentração de etanol (80%) e nível inferior de tempo (5 min).

Tabela 2 - Resultado do planejamento fatorial para o processo de extração.

Tempo (min)	Etanol (%)	Condição	Ensaio	Fenólicos totais (Z ₁) (mg EAG g ⁻¹)	DPPH (Z ₂) (μmol Trolox g ⁻¹)	FRAP (Z ₃) (μmol Fe ²⁺ g ⁻¹)
5	20	1 (C1)	1	44,36 ± 0,98	489,82 ± 44,50	1164,70 ± 43,24
5	20		2	47,49 ± 0,82	517,60 ± 26,08	1234,94 ± 31,00
5	20		3	51,94 ± 0,93	508,07 ± 41,91	1310,60 ± 46,10
5	80	2 (C2)	4	14,95 ± 0,60	169,52 ± 47,80	649,85 ± 19,26
5	80		5	19,29 ± 1,10	209,46 ± 23,63	553,45 ± 29,90
5	80		6	19,27 ± 0,26	207,72 ± 24,20	527,24 ± 22,18
15	20	3 (C3)	7	54,14 ± 0,22	592,24 ± 10,52	1318,27 ± 27,68
15	20		8	52,44 ± 0,86	542,80 ± 14,81	1223,69 ± 36,61
15	20		9	55,46 ± 0,85	557,55 ± 32,00	1218,93 ± 33,07
15	80	4 (C4)	10	28,09 ± 1,06	246,79 ± 11,74	739,76 ± 39,18
15	80		11	25,45 ± 0,39	247,64 ± 31,57	664,13 ± ± 26,32
15	80		12	22,64 ± 0,08	253,73 ± 21,21	688,57 ± 42,52
10	50	5 (C5)	13	57,02 ± 1,05	682,55 ± 31,57	1386,79 ± 21,65
10	50		14	50,05 ± 0,21	607,00 ± 29,00	1205,77 ± 34,92
10	50		15	54,24 ± 0,46	639,15 ± 19,55	1387,98 ± 27,91

Fonte: Autoria própria.

Para verificação da diferença estatística dos resultados e a afirmação de quais variáveis são significativas na extração, os resultados foram submetidos ao tratamento estatístico pelo software Statistica.

O conjunto de dados foi ajustado de acordo com a seguinte equação polinomial de primeira ordem:

$$Z = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Onde Z é a resposta esperada, β_0 representa a interseção, β_1 e β_2 são os coeficientes lineares, β_{12} é o coeficiente de interação, e por fim X_1 e X_2 são as variáveis independentes, tempo e concentração de etanol respectivamente.

A Tabela 3 apresenta o efeito para cada uma das variáveis no processo de extração de compostos fenólicos. Onde $t(11)$ é o teste t Student, referente a 11 graus de liberdade, p é a probabilidade.

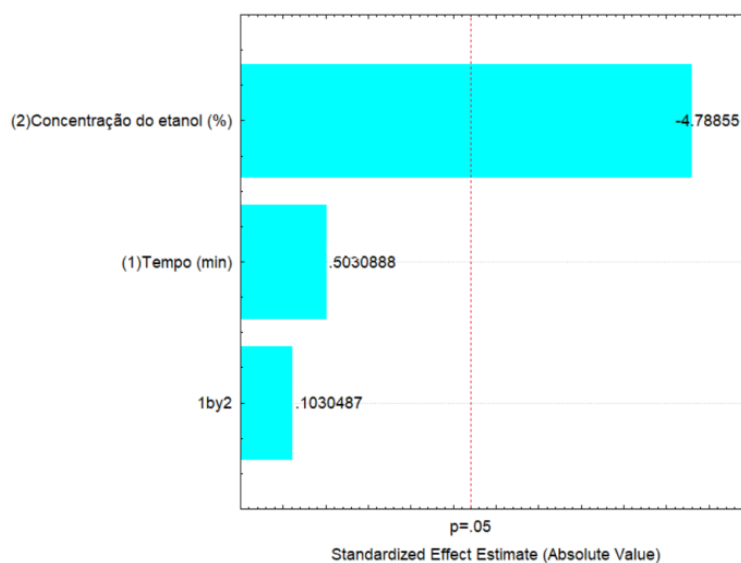
Tabela 3 - Tabela de efeito para o teor de fenólicos totais.

	Efeito	Erro	t (11)	p
Média	424,90	28,17	15,08	0,0000
Tempo	31,69	62,99	0,50	0,6248
Concentração etanol	-301,64	62,99	-4,80	0,0005
Interação concentração e tempo	6,49	62,99	0,10	0,9198

Fonte: Autoria própria.

Na análise do teor de fenólicos totais, utilizando o nível de confiança de 95%, pode-se comprovar que a varável que influenciou de forma significativa no processo de extração foi a concentração de etanol, enquanto as demais variáveis, tempo e a interação entre concentração de etanol e tempo, não apresentaram efeito significativo.

Na Figura 13 é possível visualizar o Diagrama de Pareto, o qual apresenta os efeitos das variáveis estudadas e suas interações, os efeitos considerados significativos são os que se encontram acima da linha tracejada vermelha.

Figura 13 - Diagrama de Pareto para a análise de RFC.

Fonte: Autoria própria.

A Equação (2), onde X_2 corresponde a concentração de etanol, descreve o modelo obtido pelo tratamento estatístico e foi gerada a partir do efeito significativo a extração.

$$CFT (mg EAG g^{-1}) = 424,90 - 150,82X_2 \quad (2)$$

A Tabela 4, apresenta os valores dos efeitos principais e de interação, para a análise de antioxidantes (DPPH e FRAP)

Tabela 4 - Tabela de efeito para DPPH e FRAP.

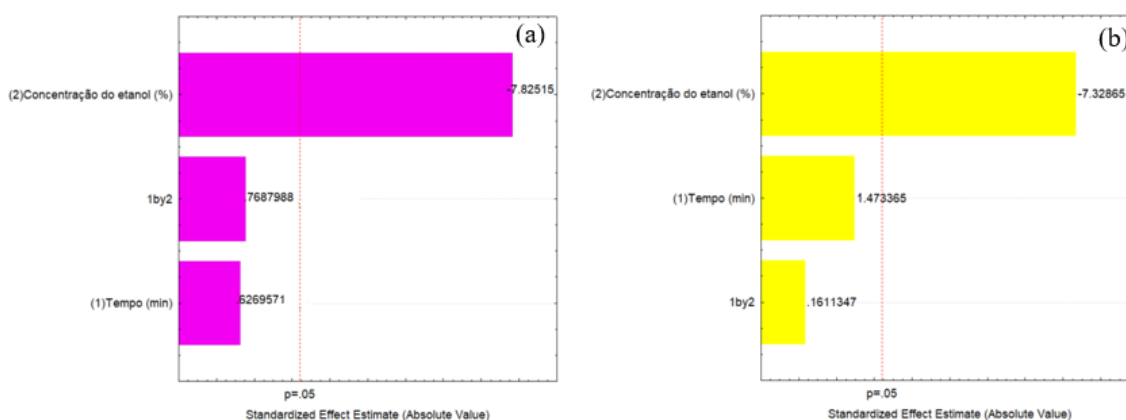
	Efeito	Erro	t (11)	p
Média	976,40 ^a	35,46 ^a	27,53 ^a	0,0000 ^a
	38,94 ^b	1,68 ^b	23,12 ^b	0,0000 ^b
Tempo	49,71 ^a	79,30 ^a	0,63 ^a	0,5435 ^a
	5,54 ^b	3,76 ^b	1,47 ^b	0,1687 ^b
Concentração etanol	-620,52 ^a	79,30 ^a	-7,82 ^a	0,000008 ^a
	-27,60 ^b	3,76 ^b	-7,33 ^b	0,000015 ^b
Interação das variáveis	61,96 ^a	79,30 ^a	0,77 ^a	0,4582 ^a
	0,61 ^b	3,76 ^b	0,16 ^b	0,8749 ^b

^a DPPH; ^b FRAP.

Fonte: Autoria própria.

Para a análise pelo método de sequestro do radical DPPH e pela redução do ferro, a um nível de confiança de 95%, pode-se comprovar também que a variável que teve significância no processo de extração foi a concentração de etanol, e as demais variáveis não apresentaram diferença significativa.

A Figura 14, apresenta o diagrama de Pareto das análises de DPPH (a) e FRAP (b), em ambos, a concentração de etanol foi significativa, com $p < 0,5$, com a barra acima da linha tracejada vermelha.

Figura 14 - Diagrama de pareto para DPPH (a) e FRAP (b).

Fonte: Autoria própria.

As equações (3) e (4), são referentes aos modelos de DPPH e FRAP respectivamente, onde X_2 corresponde a concentração de etanol, única variável significativa para ambos os modelos para a extração de compostos com atividade antioxidante.

$$DPPH (\mu\text{mol Trolox } g^{-1}) = 976,40 - 310,26X_2 \quad (3)$$

$$FRAP (\mu\text{mol } Fe^{2+} g^{-1}) = 38,94 - 13,80X_2 \quad (4)$$

A análise de variância (ANOVA) é um método bastante utilizado para avaliar a qualidade do ajuste de um modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Na Tabela 5, é possível visualizar a análise de variância, os coeficientes de regressão, valor de R^2 e o valor F, da análise de fenólicos totais (RFC), captura do radical DPPH e da redução do ferro (FRAP).

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão dos modelos, valor de R^2 e valor F.

Termo	Coefficiente RFC	Coefficiente DPPH	Coefficiente FRAP
β_0	424,90	976,4	38,9
β_1	15,84 ^a	24,9 ^a	2,8 ^a
β_2	-150,82 ^b	-310,26 ^c	-13,80 ^d
β_{12}	3,24 ^a	30,48 ^a	0,30 ^a
R^2	0,678	0,850	0,836
F calculado	2,10	20,74	3021,56
F tabelado ^e	3,59	3,59	3,59
Razão F ^f	0,59	5,78	841,66

^a não significativo em $p > 0,05$; ^b significativo em $p < 0,006$; ^c significativo em $p < 0,000008$; ^d significativo em $p < 0,00002$; ^e nível de confiança de 95%; ^f Razão $F = (F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}})$.

Fonte: Autoria própria.

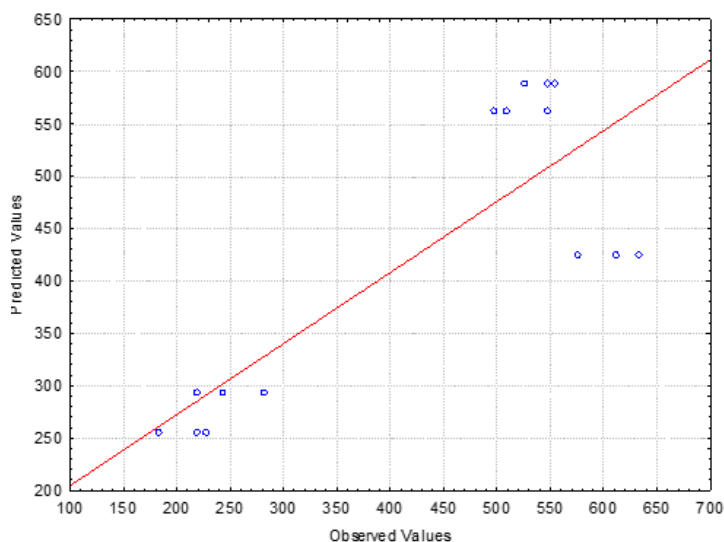
A análise de variância nos mostra que o modelo para a redução do ferro e captura do radical DPPH são estatisticamente significativos e preditivos, devido ao valor de F calculado ser 841,66 e 5,78, respectivamente, vezes maior que o F tabelado, a um nível de 95% de confiança (HAIR, *et al.*, 2009). O coeficiente de determinação, R^2 , foi 0,836

e 0,850, para FRAP e DPPH respectivamente, mostrando que os modelos são adequados, devido à proximidade a 1.

Comparado aos modelos de DPPH e FRAP, o modelo para fenólicos totais, pelo método da redução da capacidade do reagente Folin-Ciocalteu, não se ajustou tão bem, devido ao valor de F calculado ser apenas 0,59 maior que o F tabelado, e o coeficiente de determinação ser 0,678.

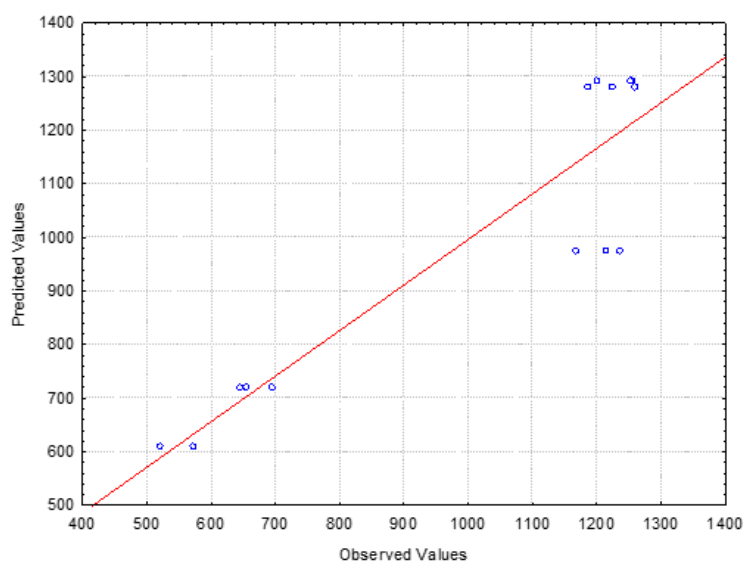
Nas Figuras 15, 16 e 17, é possível observar os gráficos de valores observados versus valores preditos, auxiliando na verificação da qualidade do ajuste dos modelos aos dados reais. Para que o ajuste do modelo aos dados seja satisfatório, os dados devem se ajustar a reta. Pode-se observar que os dados dos três modelos apresentam um desvio em relação aos valores preditos, entretanto pode-se dizer que estão num bom ajuste.

Figura 15 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de RFC.



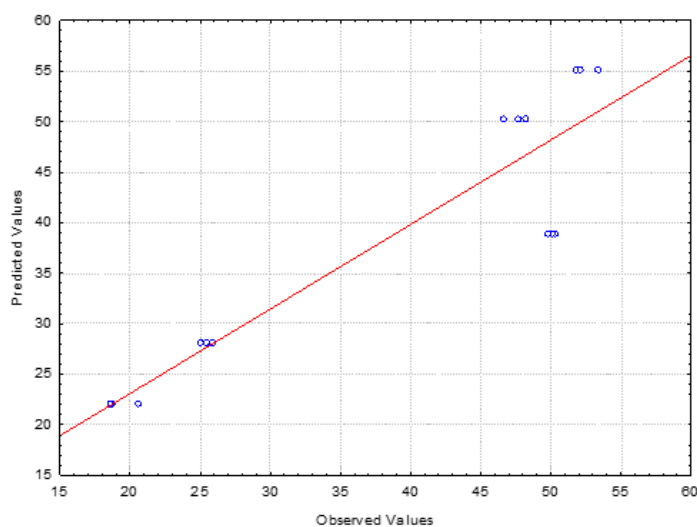
Fonte: Autoria própria.

Figura 16 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de DPPH.



Fonte: Autoria própria.

Figura 17 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de FRAP.

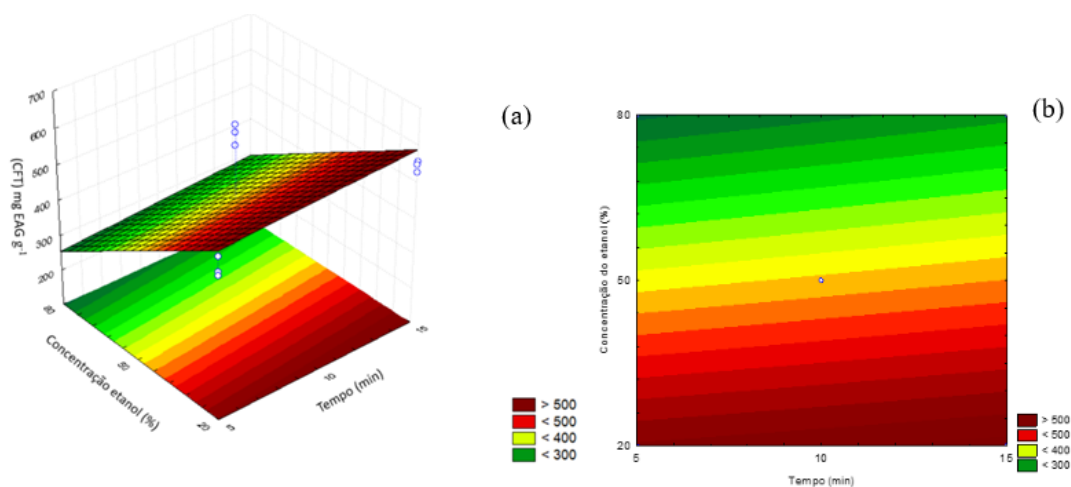


Fonte: Autoria própria.

As Figuras 18 e 19 apresentam as superfícies de resposta em 3D (a) e 2D (b), do tempo versus concentração do etanol, elas mostram a influência das variáveis independentes para o teor de compostos fenólicos e DPPH.

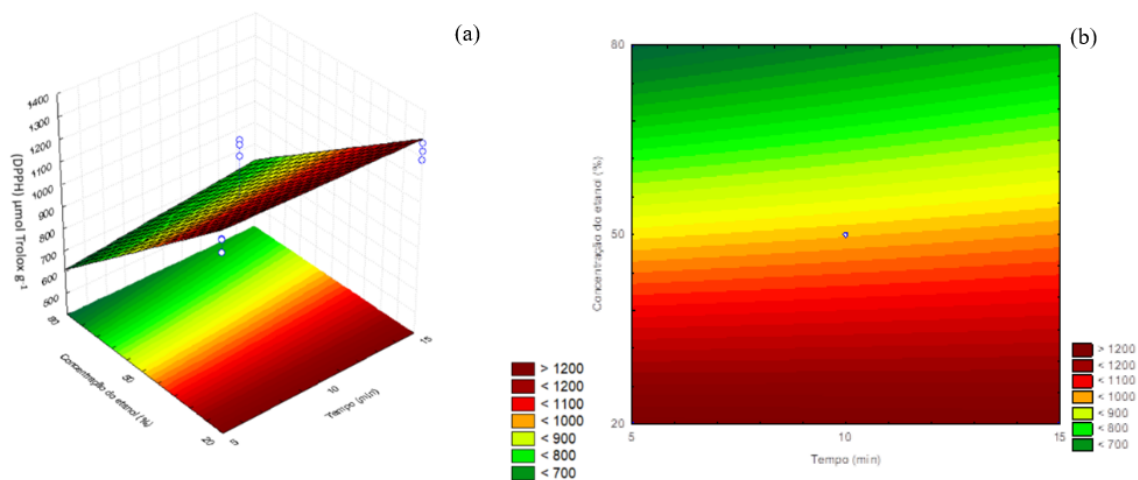
Com a análise da superfície de resposta do teor de fenólicos totais, é possível observar que o teor de fenólicos totais e o teor de compostos com capacidade antioxidante avaliado pelo método da captura do radical DPPH, atingiram o seu máximo quando se utilizou o nível inferior de concentração de etanol (20%), devido ao fato dessa variável ser a única estatisticamente significativa no processo de extração.

Figura 18 - Superfície de resposta em 3D (a) e 2D (b) da influência da concentração de etanol e tempo para RFC.



Fonte: Autoria própria.

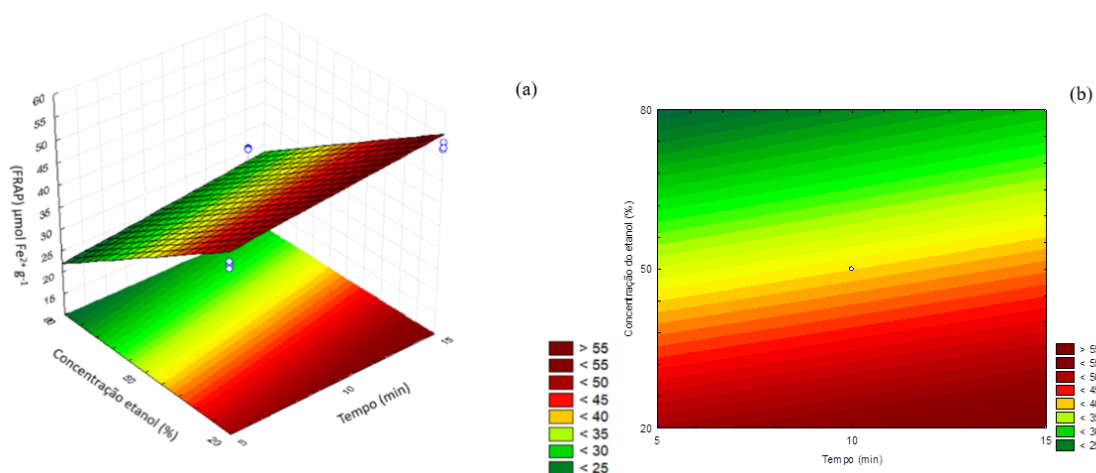
Figura 19 - Superfície de resposta em 3D (a) e 2D (b) da influência da concentração de etanol e tempo para DPPH.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 20 apresenta a superfície de resposta em 3D (a) e 2D (b), do tempo versus concentração do etanol, mostrando a influência dessas variáveis no processo de extração de compostos com potencial de redução do ferro, FRAP. Assim como para o teor de fenólicos e DPPH, o nível mínimo de concentração de etanol (20%) foi a condição ótima para a extração, e o nível superior de tempo (15 min) se mostrou mais eficiente, entretanto essa variável não é estatisticamente significativa.

Figura 20 - Superfície de resposta em 3D (a) e 2D (b) da influência da concentração de etanol e tempo para FRAP.



Fonte: Autoria própria.

5.2. Teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais variou de 14,96 a 57,02 mg EAG g⁻¹ (Tabela 2). A análise da superfície de resposta (Figura 18) mostrou que a variável significativa foi a concentração de etanol, $p < 0,0006$ (Tabela 4). Porém seu efeito foi negativo como indica a equação (2). Desta forma, quanto maior a concentração de etanol menor é a extração de compostos fenólicos.

Kataoka e Cardoso (2013) encontraram $138,15 \pm 7,17 \mu\text{g EAG mL}^{-1}$ e $182,15 \pm 4,47 \mu\text{g EAG mL}^{-1}$, em extratos hidroalcolólicos das folhas da *C. xanthocarpa* (80:20, etanol:água, por 2 horas em ultrassom) de folhas coletadas no estado vegetativo e no reprodutivo, respectivamente.

Enquanto utilizando a metodologia de extração por exaustão, etanol 95% em agitação, trocando o solvente a cada 24 horas por três dias, Catelan *et al.*, 2019, quantificou $486,37 \pm 14,45 \text{ mg EAG g}^{-1}$ em extratos a partir das folhas da planta.

Kataoka e Cardoso (2013) e Sant'Anna *et al.*, 2017, produziram extratos a partir da infusão das folhas secas e moídas, 95°C e 100°C, respectivamente. Foram encontrados teores de $68,78 \pm 1,68 \mu\text{g EAG mL}^{-1}$ em folhas retiradas no processo vegetativo e $103,53 \pm 2,79 \mu\text{g EAG mL}^{-1}$ no estado reprodutivo utilizando 95°C, para a extração e $3,7360 \pm 0,1072 \text{ mg EAG mL}^{-1}$, em folhas as *C. xanthocarpa*, com uso de 100°C. Castanha *et al.*, (2023) encontraram $1046 \text{ mg EAG g}^{-1}$, com extratos aquosos liofilizados, deixados em ultrassom por 6 horas.

Comparando os resultados obtidos nessa pesquisa com os resultados encontrados pelos autores citados, o teor de fenólicos totais obtido corrobora com os valores da literatura, considerando os protocolos de extração empregados.

5.3. Avaliação da atividade antioxidante

Os resultados obtidos nas análises da captura do radical DPPH e redução do ferro variaram de 169,52 a 682,55 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, e 649,85 a 1386,79 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 2). Ao analisar as superfícies de resposta (Figuras 19 e 20) nos mostraram que a variável significativa foi a concentração de etanol, no seu nível inferior (20%), com $p < 0,000008$ e $p < 0,00002$, para DPPH e FRAP respectivamente, com efeito negativo no processo de extração, quanto menor a concentração de etanol maior a extração, isso é comprovado pela análise das equações (3) e (4) .

Kataoka e Cardoso (2013) encontraram em extratos hidroalcoólicos (80:20) de folhas coletadas no estágio vegetativo e no reprodutivo, $90,71 \pm 0,20$ e $91,23 \pm 0,07 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, pelo ensaio de captura do radical DPPH, com extratos da infusão das folhas secas obtiveram $82,92 \pm 2,38$ e $85,40 \pm 1,40 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, estado vegetativo e reprodutivo respectivamente.

Castanha *et al.*, (2023) preparou extratos aquosos das folhas secas e trituradas, com utilização do ultrassom por 6 horas, e encontrou $0,2734 \pm 0,0106 \text{ EC}_{50} \mu\text{mol L}^{-1}$, que é a concentração da amostra necessária para a eliminação do radical DPPH.

Castanha *et al.*, (2023) encontrou $2890,95 \pm 130,61 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ realizando a análise de redução do ferro (FRAP).

Os resultados obtidos das análises de DPPH foram satisfatórios, ainda que não haja estudos o suficiente para uma melhor comparação.

5.4. Identificação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Por meio da técnica CLAE e da injeção de um mix de padrões (Figura 22) foi possível identificar o ácido gálico, catequina, rutina, isoquercetina e astragalina (Figuras 22 e 23) nos extratos de maior (C5) e menor (C2) capacidade antioxidante determinado pelas análises de bancada (CFT, DPPH e FRAP).

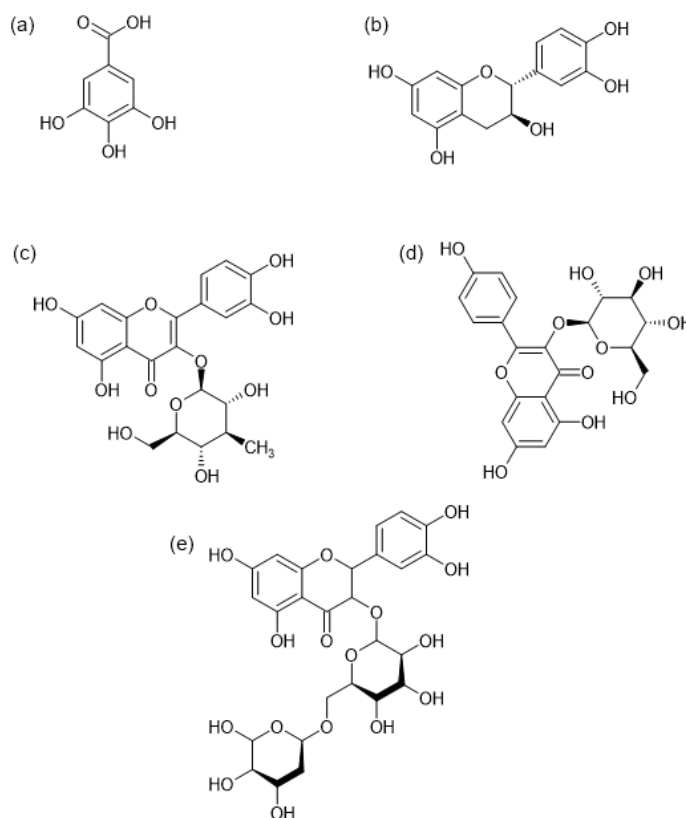
Os picos majoritários encontrados não puderam ser identificados, entretanto apresentaram bandas de 321, 268, 266 nm e de acordo com Robards e Antolovich (1997) absorções nos comprimentos de onda de 266-295 nm, corresponde a fenóis simples e para

flavonoides, o espectro apresenta duas bandas de absorção máxima nas faixas de 240-285 nm e 300-550 nm.

O ácido gálico (Figura 21 - a) é um poderoso antioxidante, com atividade anti-inflamatória, antimutagênica e antitumoral (KIM, *et al.*, 2002; KROE, *et al.*, 1992; LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2012). A catequina (Figura 21 - b) é um polifenol, que se oxida facilmente, ou seja, consegue reagir rapidamente com os radicais livre, evitando a oxidação de células saudáveis, podendo ser comparada com a capacidade antioxidante da vitamina C (ácido ascórbico) (UEDA, *et al.*, 2014).

A rutina (Figura 21 - c), mais conhecida como vitamina P, atua na redução da pressão arterial, tem efeito anti-inflamatório, anticancerígeno, atua na elevação do colesterol HDL, diminui os risco de doenças cardiovasculares, e é muito usada em medicamentos (SUN, *et al.*, 2013, RODRIGUES, *et al.*, 2003). A isoquercetina (Quercetina-3-Glicosídeo) (Figura 21 - d) tem alta biodisponibilidade e é um potente antiproliferativo (ORFALI, *et al.*, 2017). A astragalina (Figura 21 - e), é um derivado do canferol (canferol 3-O- glicosídeo), possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (DALPIZOLO, 2011).

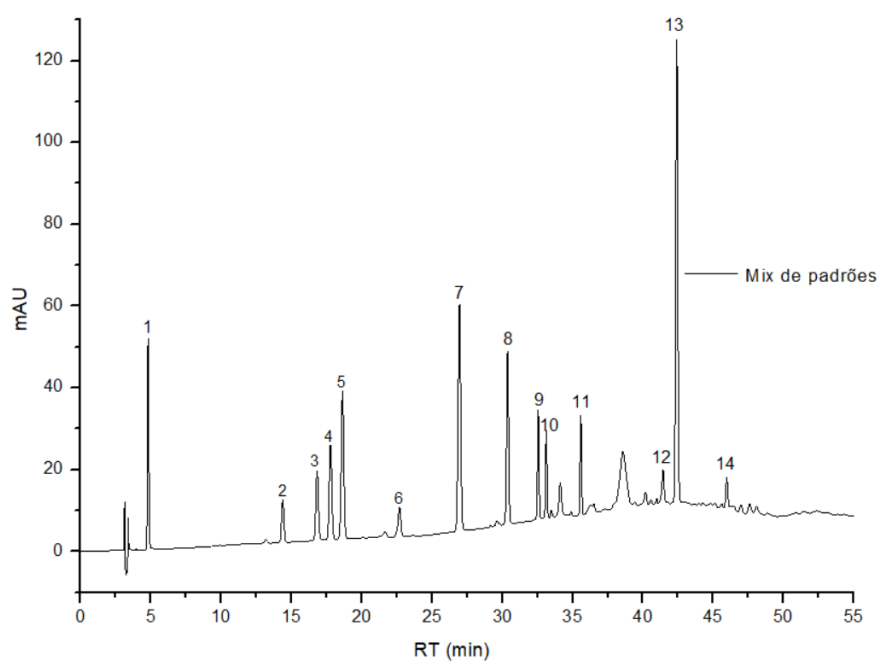
Figura 21 - Estrutura ácido gálico (a); catequina (b); rutina (c); isoquercetina (d) e astragalina (e).



Fonte: Autoria própria.

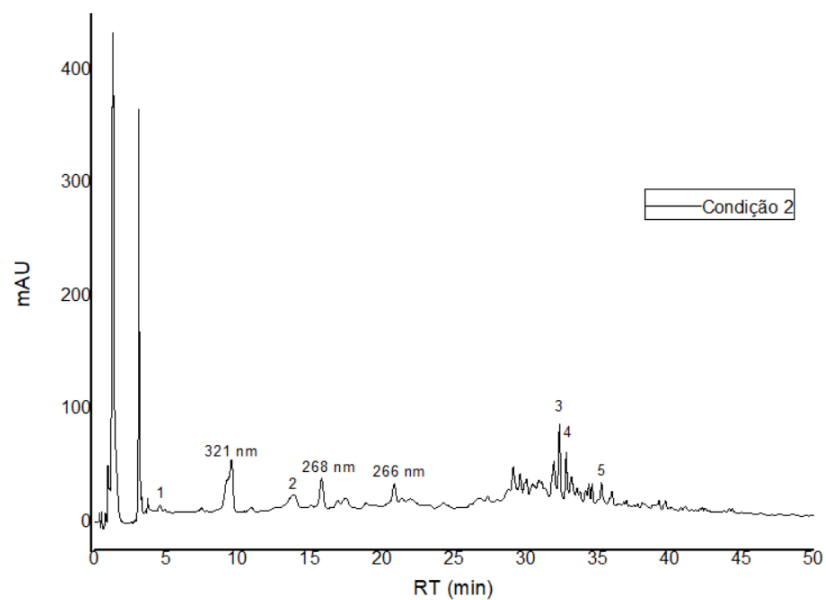
O cromatograma obtido da injeção do mix de padrões (Figura 22) foi usado como comparação para cromatogramas das amostras (Figura 23 e 24) na intenção de identificar os compostos presentes nos extratos.

Figura 22 – Cromatograma do mix de padrões, (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogênico, (4) ácido vanílico, (5) ácido cafeico, (6) epicatequina, (7) ácido ferrúlico, (8) ácido cumárico, (9) rutina, (10) isoquercetina, (11) astragalina, (12) quercetina, (13) ácido cinâmico, (14) canferol injetados na concentração 20 mg L⁻¹ e obtidos em 280 nm.



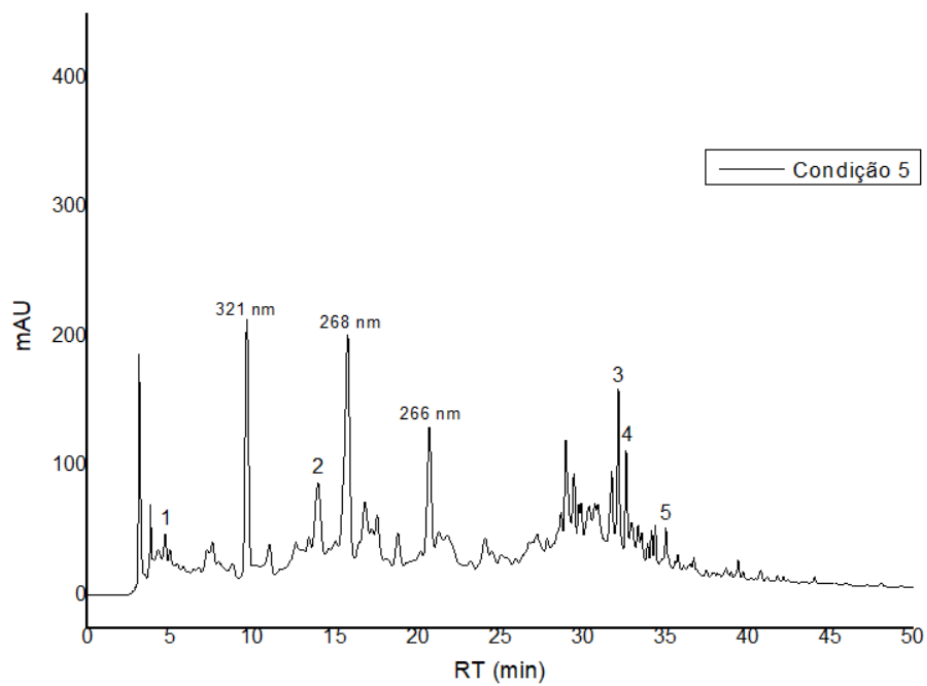
Fonte: Autoria própria.

Figura 23 – Cromatograma do extrato com menor atividade antioxidante (C2), apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) rutina, (4) isoquercetina e (5) astragalina.



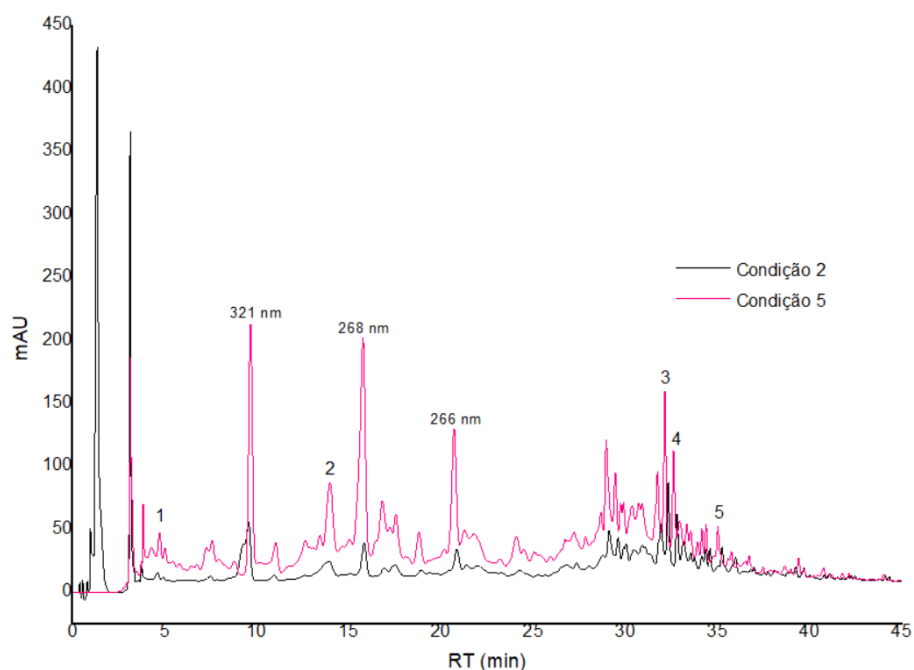
Fonte: Autoria própria.

Figura 24 – Cromatograma do extrato com maior atividade antioxidante (C5), apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) rutina, (4) isoquercetina e (5) astragalina.



Fonte: Autoria própria.

Figura 25 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos com maior (C5) e menor (C2) atividade antioxidante, apresentando os sinais (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) rutina, (4) isoquercetina e (5) astragalina.



Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a Figura 25, pode-se notar a diferença na extração de compostos, sendo que, o extrato obtido utilizando-se 50% etanol e 10 min de extração em banho de ultrassom (C5), obteve maior extração de compostos.

As curvas de calibração foram construídas com sete pontos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; $20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $30 \mu\text{g mL}^{-1}$; $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) para cada composto identificado, e apresentaram boa relação linear entre área do pico e concentração, com $R^2 > 0,999$. Através delas pôde-se quantificar os compostos que foram identificados (Tabela 6).

Tabela 6 – Tempo de retenção (T.R.), banda de absorção; equação de regressão; coeficiente de determinação (R²) e quantificação de cada composto.

Composto Fenólico	T.R. (min)	Banda UV (nm)	Equação da regressão	R ²	Concentração (mg g ⁻¹)
Ác. Gálico	4,6 ^a	266 ^a	y = 0,4271x –	0,9995	0,038 ^a
	4,7 ^b	265 ^b	0,0713		0,180 ^b
Catequina	13,9 ^a	273 ^a	y = 0,1575x –	0,9998	0,850 ^a
	14,0 ^b	278 ^b	0,0158		2,537 ^b
Rutina	32,3 ^a	254,353 ^a	y = 0,2395x + 0,009	0,9998	0,546 ^a
	32,2 ^b	257,353 ^b			1,015 ^b
Isoquercetina	32,8 ^a	256,352 ^a	y = 0,2039x –	0,9996	0,311 ^a
	32,6 ^b	256,352 ^b	0,0086		0,603 ^b
Astragalina	35,0 ^a	263,347 ^a	y = 0,4566x –	0,9998	0,030 ^a
	35,0 ^b	263,347 ^b	0,3148		0,092 ^b

^a condição C2 -1, menor tempo (5 min) e maior concentração de etanol (80%); ^b condição C5 – 1, tempo e concentração de etanol no nível intermediário (10 min e 50%).

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a Tabela 6, consegue-se confirmar que a condição 5 extraiu maior quantidade de compostos. A catequina foi a que apresentou maior concentração em ambas as condições, na condição 5 extraiu 2,98 vezes mais do composto. Entretanto os outros compostos também tiveram uma grande diferença, chegando a extrair 4,74 vezes a mais no caso do ácido gálico.

Sant'Anna *et al.*, (2017) identificou em infusos a 100°C das folhas secas, ácido gálico, ácido clorogênico, quercetina e ácido cafeico.

Kataoka e Cardoso (2013) sugeriu a presença de flavonoides, do grupo das chalconas e flavanonas nos extratos infusos (95°C) e hidroalcoólicos devido ao perfil de absorvância dos picos nos cromatogramas. Chalconas e seus derivados são substâncias de interesse químico-farmacológico, devido ao seu poder antioxidante, analgésica, anticonvulsivante e anti-inflamatória (FERREIRA, *et al.*, 2018) as flavanonas são antioxidantes poderosos, com potencial anticancerígeno, cardioprotetor e anti-inflamatória (SHOLL, 2021).

Comparando os resultados obtidos com os de Sant'Anna *et al.*, (2017), a variação dos compostos encontrados nos extratos pode ter se dado por diversos motivos, como pela diferença no solvente e o uso de temperaturas elevada.

A utilização de um solvente hidroalcolólico se mostra muito eficiente na extração de compostos dentro de matrizes complexas devido a água expandir a célula, abrindo espaço para o álcool entrar na matriz e extrair os compostos (GALANAKIS, 2012). A utilização de altas temperaturas também não é aconselhado devido a sensibilidade dos compostos fenólicos a altas temperaturas podendo degradá-las (SOUZA, 2018 apud VICKERY;VICKERY, 1981), então a utilização de uma temperatura mediana, é uma boa alternativa para quem quer utilizar o calor como uma forma de extração.

Outro fator que pode ser considerado é o uso do ultrassom, uma técnica atual que vem sendo muito utilizada. O ultrassom tem se tornado um grande aliado na extração de compostos fenólicos, tanto para análises de bancada quanto em nível industrial, devido a sua simplicidade de uso e custo reduzido. O seu poder na extração se dá pelo fenômenos chamado cavitação, onde as ondas ultrassônicas causam um ciclo de compressão e expansão, passando pelo fluido, esse movimento pode causar bolhas ou cavidades no solvente, que são responsáveis pelo cisalhamento do material vegetal, propiciando a extração (LI *et al.*, 2019; FLORES-JUMÉNEZ, *et al.*, 2019; VARDANEGA, SANTOS, ALMEIDA, 2014; CHEMAT e KHAN, 2010)

Com isso, o método otimizado nesse trabalho se mostrou muito eficiente dentro dos níveis das variáveis testadas. É um método rápido, extremamente fácil, não utiliza de equipamentos sofisticados, é econômico, como a condição ótima encontrada foi a com nível inferior de etanol, e a utilização de apenas água e etanol não a torna nociva ao pesquisador e ao meio ambiente.

6. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos para a otimização do processo de extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante, utilizando o planejamento fatorial, a concentração de etanol se mostrou estatisticamente significativa, sendo a melhor resposta quando utiliza se o nível inferior (20%) desta variável. Apesar do tempo não ser uma variável estatisticamente significativa, os resultados obtidos nos testes de bancada (CFT, DPPH e FRAP) indicam que o tempo superior a 10 min demonstrou ser mais eficiente.

A utilização da técnica CLAE, possibilitou identificar os compostos presentes nos extratos, ácido gálico, catequina, rutina, isoquercetina e astragalina, que são poderosos antioxidantes naturais.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 20 out. 2010.

APAK, R. *et al.* Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n.26, p. 7970-7981, 25 nov. 2004.

ATMANI, D. *et al.* Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 303-309, 20 mai. 2008.

BARROS NETO, Benicio de; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2001. 413 p.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 23 jan. 1996.

BIAVATTI, M.W. *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 385–389, 14 abr. 2004.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, Londres, v. 28, p. 25-30, 28 jun. 1994.

CAPELETTO, C. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**, p. 32-38, 21 dez. 2015.

CARVALHO, P. E. R. **Guabiroba**. Separata de: Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa, 2006. v. 2, p. 260-269.

CASTANHA, E *et al.* Non-covalent binding of phenolic compounds from leaves of *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg with ovalbumin: Effect on protein structure, amino acids involved in the complexation and antioxidant activity. **Food Chemistry Advances**, [S. l.], v. 2, p. 1-10, 11 maio 2023.

CATELAN, T.B.S. *et al.* Evaluation of the in vitro photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, p. 1011-1344, 25 abr. 2019.

CHEMAT, F; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 10 dez. 2010.

CORADIN, L.; CAMILLO, J. Introdução. *In*: ESPÉCIES Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2016. p. 19-26.

DALPIZOLO, C.A. **Estudo analítico da presença de Astragalina em cultivares de feijão vulgaris L.** 2011. Dissertação Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FLORES-JIMÉNEZ, N.T. *et al.* Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. **Food Research International**, v. 121, p. 947–956, 10 jan. 2019.

GALANAKIS, C.M. *et al.* A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. **International Journal of Food Properties**, v. 16, p. 382–396, 21 dez. 2012.

GALLICE, W. C. **Caracterização do potencial antioxidante de vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas**

cromatográficas e espectroscópicas multivariadas. 2010. Dissertação Mestrado - Programa de Pós-graduação em Química do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GIL-CHAVEZ, G.J. *et al.* Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 5-23, 25 ago. 2012.

GIOXARI, A. *et al.* Phenolic Compounds: Bioavailability and Health Effects. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 339-345, 1 dez. 2016.

GOV.BR. **Biodiversidade**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>. Acesso em: 28 out. 2022.

HAIR, J. F.; *et al.* **Análise multivariada de dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 687 p.

HALLIWEL, B. How to characterize an antioxidant: an update. **Biochemical Society Symposia**, p. 73- 101, 1 dez. 1995.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Santa Maria**, p. 43-48, 30 jul. 2007.

HOMCZINSKI, I. *et al.* Biometric characterization of *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg. in an araucaria forest. **Acta Biológica Catarinense**, p. 91-99, 1 dez. 2017.

IBGE EDUCA. **Biomass brasileiros**. 2022. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18307-biomass-brasileiros.html#>. Acesso em: 28 out. 2022.

JOVANOVIC, A. *et al.* Polyphenols extraction from plant sources. **Review Article**, v. 37, p. 45-49, 25 dez. 2017.

KAJDZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of Different Extraction Solvent Mixtures for Characterization of Phenolic Compounds in Strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 5272-5278, 15 abr. 2011.

KATAOKA, V.M.F.; CARDOSO, C.A.L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira**, Botucatu, v. 15, p. 121-129, 6 set. 2013.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **PHYTOCHEMICAL ANALYSIS**, v. 13, p. 105–113, 20 dez. 2001.

KELLY, N.P.; KELLY, A.L.; O'MAHONY, J.A. Strategies for enrichment and purification of polyphenols from fruit-based materials. **Trends in Food Science & Technology**, 1 nov. 2018.

KIM, D; *et al.* Vitamin C Equivalent Antioxidant: Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, ed. 13, p. 3713–3717, 2002. Acesso em: 21 mai. 2023.

KROE, B. H. *et al.* Anti-Inflammatory Activity of Gallic Acid. **Planta Medica**, v. 58, p. 499-504, 1992. Acesso em: 21 mai. 2023.

LEÓN, O.; ALEXANDRA, N. **Evaluación de antioxidantes provenientes de subproductos de mango em galletas**. 2015. Monografía. Universidad Técnica Particular de Loja – La Universidade Católica de Loja, Loja, 2015.

LI, W. *et al.* Ultrasound - The physical and chemical effects integral to food processing. **Reference Module in Food Science**. 1 jan. 2021.

LOBO, V. *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, p. 118-126, 8 mar. 2010.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 60, p. 233-239, 2012. Acesso em: 21 mai. 2023.

MACEDO, J.G.F. *et al.* Composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e moduladora do óleo essencial da espécie psidium L. (Myrtaceae Juss.). **Biocatálise e Biotecnologia Agrícola**, v. 42, 1 jul. 2022.

MESSIAS, M.C.T.B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, p. 76 - 104, 4 jun. 2014.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, 30 jan. 2009.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001. 401 p. v. 1.

OLDONI. T.L.C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. Tese Doutorado - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, A. G. **Sistemática de *Eugenia* (Myrtaceae, Myrtae): um estudo da flor e da inflorescência e implicações taxonômicas**. 2018. Tese – Doutorado em ciências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira**, Campinas, v. 17, p. 36-44, 28 maio 2014.

OLIVEIRA, S. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. Dissertação – Mestrado em ciências. 2011. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

- ORFALI, G.D.C. *et al.* Mecanismo antitumorigênico da isoquercetina no adenocarcinoma de cólon: um estudo experimental com camundongos atímicos. **Journal of coloproctology**, São Paulo, v. 37, p. 14-15, 2017. Acesso em: 21 mai. 2023.
- PEREIRA, M.C. *et al.* Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 3061–3067, 7 mar. 2012.
- ROBARDS, K; ANTOLOVICH, M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids: A Review. **The Analyst**, v. 122, p. 11-34, 1 fev. 1997.
- RODRIGUES, H.G. *et al.* Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, p. 315-320, 2003. Acesso em: 21 mai. 2023.
- RODRIGUES, M.I.; LEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. rev. e aum. Campinas: Cárita Editora, 2009. 357 p. v. 1.
- SALVADOR, M.J. *et al.* Antioxidant Capacity and Phenolic Content of four Myrtaceae Plants of the South of Brazil. **Natural Product Communications** , v. 6, n. 7, p. 977 - 982, 26 mar. 2011.
- SANT'ANNA, L. S. *et al.* Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa*. **Hindawi**, p. 1-11, 11 maio 2017.
- SANTOS, C. M. R. **Desenvolvimento estrutural associado à biologia reprodutiva de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae)**. 2013. Tese Doutorado – Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- SHARMA, V.; JANMEDA, P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. **Jornal Árabe de Química**, v. 10, n. 4, p. 509-514, 9 maio 2017.
- SHELLEY, M. **Frankenstein**. Barueri: Editora Camelot, 1818. p. 36.

SHOLL, Luke. O que São as Flavanonas?. *In: Cibol*. 10 dez. 2021. Disponível em: <https://www.cibdol.pt/enciclopedia-cbd/o-que-s%C3%A3o-as-flavanonas>. Acesso em: 30 ma. 2023.

SIDOL: Sistema de Identificação Dendrológica Online – Floresta Ombrófila Mista.

Glossário ilustrado. 2012. Disponível em:

<https://www.florestaombrofilamista.com.br/sidol/?menu=glossary#:~:text=Oblonga%3A%20cerca%20de%20duas%20vezes,e%20com%20bordos%20relativamente%20paralelos.&text=Orbicular%3A%20onde%20a%201%C3%A2mina%20%C3%A9,arredonda da%20semelhante%20a%20uma%20circunfer%C3%A4ncia.&text=Ovada%3A%20cerca%20de%20duas%20vezes,e%20com%20bordos%20relativamente%20paralelos>. Acesso em: 03 fev. 2023.

SILVA, E.R.S. *et al.* Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. **Springer Science+Business Media**, Nova York, p. 1-7, 7 jun. 2016.

SILVA, C. **Fracionamento bioguiado de folhas de *Syzygium malaccense***. 2018. Monografia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

SIMOMUKAY, Elton. *et al.* **Fundamentos de análise instrumental**. Porto Alegre: Sagah, 2022. 193 p.

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**, San Diego, 299, p. 152-178, 1999.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica: Tradução da 9ª edição norte-americana**. 9. ed. São Paulo: Trilha, 2015. 1068 p.

SOARES, A. E. R. *et al.* **Flora do Brasil 2020**. 2020.

SOUZA, C. I. **Extração aquosa de compostos fenólicos presentes em folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L) e encapsulamento em esperas de alginato de cálcio**. 2018. Monografia – Bacharel em Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.

SUN, W. *et al.* Application of poly(acridine orange) and graphene modified carbon/ionic liquid paste electrode for the sensitive electrochemical detection of rutin. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 109, p. 298-304, 2013. Acesso em: 21 mai. 2023.

VALLILO, M.I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, p. 231-237, 10 jan. 2008.

VARDANEGA, R; SANTOS, D.T.; ALMEIDA, M.A. de. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8 ed. 16, p. 88-96, 10 jun. 2014.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 20 jan. 2006.

VIVEIRO CIPREST – PLANTAS NATIVAS E EXÓTICAS. **Guabiroba laranja ou paulista**. 15 dez. 2017. Disponível em: <https://ciprest.blogspot.com/2017/12/guabiroba-laranja-paulista-campomanesia.html>. Acesso em: 20 out. 2022.